EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS HUMORALER ANTIKÖRPER GEGEN CHEMISCH MODIFIZIERTE GLIOMZELLEN DER RATTE

Mariette Hultén-Bolender

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546806_0005

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München
Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. D. Stavrou

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS HUMORALER ANTIKÖRPER GEGEN CHEMISCH MODIFIZIERTE GLIOMZELLEN DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Mariette Hultén-Bolender
aus Borås

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent:	Prof. Dr. D. Stavrou
Korreferent:	Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	3
C. PROBLEMSTELLUNG	8
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	9
I. Material und Methoden	9
1. Versuchstiere	9
2. Zellmaterial	9
2.1. Tumoren	9
2.1.1. Tumorinduktion	9
2.1.2. Tumorzellinien	10
2.2. Licht- und Elektronenmikroskopie	10
2.3. Gewebezüchtung	11
2.3.1. Etablierung	11
2.3.2. Subkultivierung	12
2.3.3. Klonierung	13
2.3.4. Konservierung	13
2.4. Gliazellkulturen	14
3. Gliaspezifische Proteine	14
4. Tumorogenität	15
5. Immunisierungen	16
5.1. Ratten	16
5.1.1. Zellen	16
5.1.2. Chemische Modifikation	17
5.1.3. Immunisierungsprotokolle	17
5.1.4. Applikationsform	19
5.2. Kaninchen	19

Seite

6. Seren 20
6.1. Serumgewinnung 20
6.1.1. Ratten 20
6.1.2. Kaninchen 20
6.1.3. Komplement 20
6.2. Absorptionen 21
6.2.1. Zellen 21
6.2.2. FKS 21
7. Immunologische Untersuchungstechniken zum Nachweis humoraler Gliomantikörper 22
7.1. Immunofluoreszenz-Test 22
7.2. Mikrocytotoxicitäts-Test 23
7.3. Immun-Adhärenz-Test 24

II. Ergebnisse 27

1. Lichtmikroskopie 27
1.1. Tumoren 27
1.2. Zellkulturen 28
2. Elektronenmikroskopie 30
2.1. Tumoren 30
2.2. Zellkulturen 31
3. Gliaspezifische Proteine 31
4. Tumorogenität 32
4.1. Tumortransplantation 32
4.2. Tumorwachstum 34
4.3. Tumorregression 35
5. Humorale Gliomantikörper 35
5.1. Immunofluoreszenz-Test 35
5.2. Mikrocytotoxicitäts-Test 36
5.2.1. Seren immunisierter Tiere 36
5.2.2. Absorptionen 42
5.2.3. Kreuzreaktionen 42
5.2.4. Seren tumortragender Tiere 44

Seite

5.3. Immun-Adhärenz-Test 46
5.3.1. Seren immunisierter Tiere 48
5.3.2. Kreuzreaktionen 48
5.3.3. Seren tumortragender Tiere 50

E. DISKUSSION 52

F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY 60

G. LITERATURVERZEICHNIS 64

A. EINLEITUNG

Immunologische Abwehrreaktionen gegen Tumoren sind an das Vorhandensein spezifischer oder tumorassoziierter Antigene vor allem an der Oberflächenmembran der Tumorzellen gebunden. Die meisten Tumoren beim Menschen und bei verschiedenen Tierspezies exprimieren derartige Antigene, die allerdings oft nur schwach ausgeprägte immunogene Eigenschaften entfalten. Gegen tumorspezifische bzw. tumorassoziierte Antigene ausgelöste humorale und zelluläre Abwehrreaktionen können in standardisierten in-vitro-Tests qualitativ und quantitativ erfaßt werden.

Die antigenen Eigenschaften neurogener Tumoren des Menschen sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen (Lit. bei NEUWELT und CLARK, 1978). Dabei konnten über das Vorhandensein humoraler und zellulärer Immunantworten Rückschlüsse auf das Vorkommen gliomassoziierter Antigene gezogen werden. Darüberhinaus haben tumorimmunologische Studien ergeben, daß auch chemisch induzierte Hirntumoren bei Versuchstieren Antigene besitzen, die nachweisbare Immunreaktionen hervorzurufen vermögen (LIM und KLUSKENS, 1972; DAY und BIGNER, 1973; STAVROU et al., 1977, 1978a + b; CRAVIOTO, 1978). Experimentelle Gliome syngener Ratten bieten als Modell für neuroonkologische Untersuchungen eine Möglichkeit zur Darstellung gliomassoziierter Antigene, wobei Immunreaktionen gegen Histokompatibilitätsantigene weitestgehend unberücksichtigt bleiben können.

Es ist schwierig zu beurteilen, welche Beteiligung zirkulierenden Antikörpern bei der Tumorabwehr zukommt, da sie in verschiedener Weise in das Tumorgeschehen eingreifen können. Einerseits führen cytotoxische Antikörper oft zu einer Beeinträchtigung des Tumorwachstums,

andererseits scheinen sie auch eine bedeutende Rolle bei Mechanismen zu spielen, die das Tumorwachstum fördern. Dabei führen vermutlich zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe durch Bindung der Antigen-Hälfte des Komplexes an sensibilisierte Lymphocyten zu einer Blockierung der zellvermittelten Immunreaktionen. Es ist auch wahrscheinlich, daß zirkulierende Antikörper die antigenen Determinanten eines Tumors besetzen und somit die maskierte Tumorzelle von den sensibilisierten Lymphocyten nicht mehr erkannt wird (WARNATZ, 1975).

Bemühungen zum Nachweis humoraler Gliomantikörper bei syngenen Ratten dienen dazu, Kenntnisse über die Art und den Verlauf von Immunreaktionen gegen Gliome zu gewinnen. Ziel der neuroonkologischen Forschung ist es, geeignete Methoden zur diagnostischen Beurteilung bzw. Früherkennung von neurogenen Tumoren zu entwickeln und die Voraussetzungen für eine Immunotherapie zu schaffen.

B. LITERATURÜBERSICHT

Das Vorkommen tumorassoziierter Antigene in manchen menschlichen Tumoren wird kaum mehr bezweifelt (HELLSTRÖM et al., 1971; OETTGEN et al., 1971; KLEIN, 1972). Zum Nachweis der Antigenität neurogener Tumoren sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden (Lit. bei CRAVIOTO, 1978). Besonders in den früheren neuroonkologischen Studien konnte keine eindeutige Spezifität der Antigenität von Gliomen festgestellt werden (REICHNER, 1933; SIRIS, 1936; HASS, 1966; WICKREMESINGHE und YATES, 1971; KOLDOWSKY und WEINSTEIN, 1973). Dagegen geht aus der Literatur der letzten 10 Jahre hervor, daß zumindest bei einigen Hirntumorpatienten spezifische Antigliom-Antikörper vorhanden sind (TROUILLAS, 1971; WAHLSTRÖM et al., 1974; COAKHAM, 1974; KORNBLITH et al., 1974; SHEIKH et al., 1977; WOOSLEY et al., 1977; WIKSTRAND et al., 1977; COAKHAM et al., 1980).

Auch experimentelle Neoplasien besitzen antigene Eigenschaften (BALDWIN, 1955; KLEIN, 1966; HELLSTRÖM und HELLSTRÖM, 1969; OLD und BOYSE, 1969). In mehreren Untersuchungen wird über Immunreaktionen gegen nitrosamidinduzierte neurogene Tumoren berichtet (TOH und GULI, 1974; CORNAIN et al., 1975; STAVROU, 1976; RAINBIRD und RIDLEY, 1977; STAVROU et al., 1977, 1978a; CRAVIOTO, 1978; SPENCE et al., 1979). Bei einigen dieser experimentellen Hirntumoren konnten meßbare Abwehrreaktionen humoraler und/oder zellulärer Art im autologen und syngenen System festgestellt werden. Andere Autoren konnten im xenogenen System ebenfalls nachweisen, daß chemisch induzierte Gliome Antigene enthalten, die erkannt und gezielt beantwortet werden (LIM und KLUSKENS, 1972; DAY und BIGNER, 1973; FIELDS et al., 1975).

Während TROUILLAS (1972, 1973) ein in menschlichen Glioblastomen und im fetalen Hirn vorkommendes Antigen beschreibt, brachten weitere Bemühungen zum Nachweis einer Reexpression onkofetaler Antigene weder bei menschlichen noch bei experimentellen Gliomen eindeutige Ergebnisse (DELPECH et al., 1972; WAHLSTRÖM et al., 1973; HIRT und CRAVIOTO, 1974).

Wie für andere menschliche Tumoren des gleichen histologischen Typs (MORTON et al., 1968, BUBENIK et al., 1970; HELLSTRÖM und HELLSTRÖM, 1971) gibt es auch Hinweise auf das Vorkommen kreuzreagierender Antigene bei menschlichen Hirntumoren (COAKHAM, 1974; KORNBLITH et al., 1974; WAHLSTRÖM et al., 1974; SHEIKH et al., 1977; WIKSTRAND et al., 1977; PFREUNDSCHUH et al., 1978; COAKHAM et al., 1980). Kreuzreaktionen bei chemisch induzierten Neoplasien werden als selten betrachtet (HERBERMAN, 1977). Jedoch wurden kreuzreagierende Antigene auch bei chemisch erzeugten Tumoren von einigen Autoren beschrieben (STEELE und SJÖGREN, 1974; HELLSTRÖM et al., 1978).

Da es sich bei den tumorassoziierten Antigenen im allgemeinen um schwache Antigene handelt und dies auch für gliomassoziierte Antigene zutrifft (CORNAIN et al., 1975; STAVROU et al., 1978a; SPENCE et al., 1979) wird nach Möglichkeiten gesucht, die Antigenität von Gliomzellen zu potenzieren.

Für zahlreiche Immunisierungs- und Immunotherapieversuche wurden BCG-Präparationen eingesetzt. Häufig wurde complettes Freund'sches Adjuvans (CFA; Suspension von hitzeabgetöteten Mykobakterien in Mineralöl) zur Stimulierung der hauptsächlich zellbedingten Immunreaktion verwendet (BANSAL und SJÖGREN, 1973; WARNATZ, 1975).

Mehrere Autoren berichten über erfolgreichen Einsatz von BCG (BALDWIN und PIMM, 1973a und b; ZBAR et al., 1972; WARNATZ, 1975), andere erhielten negative Resultate (SANFORD, 1967; PIESSEN et al., 1970; ALBRIGHT et al., 1975).

Unter den zahlreichen Reagenzien zur Verstärkung der Antigenität von Tumorzellen durch chemische Alterationen an der Zellmembran spielt das Enzym Vibrio cholerae-Neuraminidase (VCN) eine bedeutende Rolle. Die Befunde von LINDEMAN und KLEIN (1967) und SANFORD (1967) über die Abnahme der Tumorogenität in vivo nach in-vitro-Behandlung der Tumorzellen mit VCN bestätigten sich in mehreren erfolgreichen Immunisierungs- bzw. Immunotherapieversuchen (CURRIE und BAGSHAWE, 1968; SIMMONS et al., 1971; BEKESI et al., 1972; RAY et al., 1975; SEDLACEK et al., 1975; ELLING und STAVROU, 1980). Dagegen ist es anderen Autoren nicht gelungen, nach VCN-Behandlung der Tumorzellen weder eine Minderung der Tumorogenität zu erreichen (HAUSCHKA et al., 1971; YUHAS et al., 1974; FROESE et al., 1974; PIMM et al., 1978), noch eine effektive Immunotherapie durchzuführen (DORÉ et al., 1974; ALBRIGHT et al., 1975).

Über eine Beeinflussung der Antigenität von Tumorzellen durch Lektine (Concanavalin A) wird in den letzten Jahren ebenfalls berichtet. In einigen Fällen konnte, zumindest partiell, eine Erhöhung der Antigenität von Tumorzellen erzielt werden (SHOHAM et al., 1970; MARTIN et al., 1971; SIMMONS und RIOS, 1975).

Verschiedene Reagenzien, die chemisch definierte Reaktionen mit Proteinen eingehen, wurden schon auf ihre Eignung getestet, die antigenen Eigenschaften von Tumorzellen zu verstärken (Lit. bei PRAGER und BAECHTEL,

1973). Mehrere Faktoren, wie Eigenschaften der verwendeten Zellinien, Antigenmenge und Typ der chemischen Modifikation beeinflußten die Ergebnisse der durchgeführten Immunisierungen. Nach den bislang vorliegenden Ergebnissen hat sich die von KLEIN (1969) vorgeschlagene Kupplung von DNP-Gruppen an Zellmembranproteine als besonders erfolgversprechend erwiesen (BAKER und TAUB, 1973).

In Immunisierungsversuchen von MARTIN et al. (1971) konnte gezeigt werden, daß mit bestrahlten DNP-behandelten EL-4-Zellen eine stärkere Immunreaktion ausgelöst wurde als mit bestrahlten, unbehandelten EL-4-Zellen. Ferner berichten CAVALLO und FORNI (1974) über gesteigerte Antigenität von ADK-lt-Tumorzellen nach Behandlung mit DNP. SHEARER (1974) fand bei in-vitro-Experimenten, daß trinitrophenylierte Milzzellen zwar zu einer Erhöhung der Cytotoxicität von Milzzellen führten, die sich aber nicht spezifisch gegen TNP, sondern gegen die Zelloberflächenkomponenten mit oder ohne TNP-Anteile richtete. Gezielte Reaktionen von T-Lymphocyten gegen TNP-modifizierte Antigene konnten von BURAKOFF et al. (1976) und LEMONNIER et al. (1977) nachgewiesen werden. Von GALILI et al. (1976) wurde festgestellt, daß durch Immunisierung mit TNBS-modifizierten YAC-Zellen eine stärkere humorale Antikörper-Antwort und ein besserer Schutz gegen YAC-Zellen-"challenge" als bei den Kontrolltieren erzielt wurde.

Von STAAB und ANDERER (1977) wird auf Dimethylsulfat (DMS) hingewiesen, das sich in ihren vergleichenden Untersuchungen am besten eignete, eine Antigenitätssteigerung von Tumorzellen zu erzielen. Mit DMS-behandelten Zellmembranen immunisierte Mäuse entwickelten in 60% der Fälle eine belastbare Immunität (STAAB und ANDERER, 1978).

Aufgrund der schwachen Immunogenität gliomassoziierter Antigene und der daraus resultierenden geringen Immunantwort können gliomassoziierte Antigene meist nur mit empfindlichen in-vitro-Methoden nachgewiesen werden. Der komplementabhängige Mikrocytotoxicitäts-Test (AMOS et al., 1969; GÖTZE et al., 1972) wurde wiederholt zum Nachweis cytotoxischer Antikörper gegen verschiedene Tumoren angewandt. Gliom-Antikörper konnten durch diesen in-vitro-Test ebenfalls erfaßt werden (LEVY et al., 1972; KORNBLITH et al., 1974; WOOSLEY et al., 1977; STAVROU et al., 1978a).

Die indirekte Immunofluoreszenz-Technik nach COONS et al. (1957) hat sich auch als Nachweismethode gliomassoziierter Antigene bewährt. Sowohl bei Hirntumorpatienten (WAHLSTRÖM et al., 1974; SOLHEID et al., 1976; WIKSTRAND et al., 1977) als auch im Tierexperiment (TOH und GAUCHI, 1974; STAVROU et al., 1978a) konnten damit gegen Gliomzellantigene gerichtete Antikörper aufgezeigt werden.

Das Phänomen der Immun-Adhärenz ist als die Adhärenz eines Antigen-, Antikörper- und Komplement-Komplexes an Primaten-Erythrocyten definiert worden (NELSON, 1953). Mit dem von NISHIOKA (1963) und NISHIOKA und LINSCOTT (1963) weiter entwickelten Immun-Adhärenz-Test lassen sich Antigene an der Oberfläche von Tumorzellen sowohl in Suspension als auch in Monolayer-Kulturen nachweisen (ITO und TAGAYA, 1966; NISHIOKA et al., 1967; O'NEILL, 1968; TACHIBANA und KLEIN, 1971). Auch bei einigen menschlichen Gliomen sind immunologische Reaktionen mit Hilfe der Immun-Adhärenz-Technik dargestellt worden (PFREUNDSCHUH et al., 1978; COAKHAM et al., 1980).

C. PROBLEMSTELLUNG

Aus der Literatur ist bekannt, daß zumindest bei einigen menschlichen und experimentellen Gliomen tumorassoziierte Antigene vorhanden sind. Diese gliomassoziierten Antigene werden übereinstimmend als schwach immunogen charakterisiert.

Mit dem Ziel, durch die Potenzierung der Antigenität von Gliomzellen eine stärkere Immunantwort zu induzieren, sollten verschiedene Immunisierungsmethoden mit chemisch modifizierten syngenen Gliomzellen durchgeführt, auf ihre Effektivität in vivo geprüft und in vitro durch qualitative und quantitative Erfassung der humoralen Immunreaktionen der Recipienten beurteilt werden. Der Nachweis der Spezifität der erzeugten Antikörper müßte mittels verschiedener Absorptionen und Kreuzreaktionen erfolgen. Darüberhinaus sollte auch eine mögliche Korrelation zwischen der humoralen Cytotoxicität und dem Wachstum subkutan transplantierter Tumoren in die Untersuchung mit einbezogen werden.

Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, eine für Gliome geeignete Immunisierungsmethode zu entwickeln, um die Gliom/Wirt-Wechselbeziehungen näher zu studieren.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten syngene weibliche und männliche Fischer-Ratten (F 344) im Alter von 2 bis 52 Wochen, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Ein Jahr alte männliche Groß-Chinchilla-Kaninchen kamen ebenfalls zur Anwendung. Alle Tiere erhielten als Standarddiät Altromin(R) und Wasser ad libitum.

2. Zellmaterial

2.1. Tumoren

2.1.1. Tumorinduktion

Die Induktion neurogener Primärtumoren erfolgte bei ingezüchteten Fischer-Ratten nach den Ausführungen von DRUCKREY et al. (1965). Vom 6. Lebensmonat an wurde den Tieren wöchentlich - nach einer 24-stündigen Durstperiode - eine mit 1%igem primären Natriumphosphat gepufferte und auf pH 6,2 eingestellte (THOMAS et al., 1967) N-Methyl-N-Nitrosoharnstofflösung (6 mg/kg N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff auf 10 ml Leitungswasser) als Trinkwasser angeboten. Nähere Angaben über Behandlungsdauer, Prozentsatz der Tumorinduktion usw. finden sich bei STAVROU (1970).

2.1.2. Tumorzellinien

Von den induzierten Hirntumoren, die in vitro explantiert und gezüchtet wurden, konnten folgende Zellinien isoliert werden, die für diese Untersuchungen Verwendung fanden:

a) 78FR-G-219 (Fischer-Ratten-Gliom): Die Kultur 78FR-G-219 stammt von einem in der linken Hemisphäre des Großhirns lokalisierten pleomorphen Gliom.

b) 78FR-G-284: Diese Kultur wurde aus einem in der Pons lokalisierten Mischgliom II isoliert.

c) 78FR-G-299: Diese Kultur wurde aus einem in der linken Hemisphäre des Großhirns entstandenen Astrocytom I-II etabliert.

d) 78FR-G-344: Diese Zellinie stammt von einem in der rechten Hemisphäre des Großhirns lokalisierten Mischgliom II.

2.2. Licht- und Elektronenmikroskopie

Nach der Sektion wurde ein Teil des Tumors für die lichtmikroskopische Untersuchung in 6%igem neutralen Formol, das 0,9% NaCl enthielt, fixiert und in Paraplast(R) eingebettet. Die anschließende Färbung der Schnitte erfolgte in der Regel mit Hämatoxilin-Eosin und nach Nissl.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden entsprechende Tumorproben 2 h in 6,25%igem Glutaraldehyd fixiert, in Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen, abermals

in 1%igem Osmiumtetroxid fixiert und nach Aceton-Dehydrierung in Epon eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Für zellmorphologische Untersuchungen wurden alle fünf Passagen auf "cover-slips" in "Leighton-tubes" gewachsene Kulturen gefärbt. Die Lamellen wurden 3 x in PBS-A (Ca^{++} und Mg^{++}-frei, pH 7,2) gewaschen, 30 min in Bouin-Lösung fixiert, in einer absteigenden Alkoholreihe gewaschen, 20 min mit Hämatoxilin gefärbt, gewässert und anschließend 2 min mit Eosin gefärbt. Vor der Einschließung in Kanadabalsam wurden sie in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert.

Die Zellkulturen wurden zur elektronenmikroskopischen Beurteilung in den Kulturflaschen 3 x mit PBS-A gewaschen, mit 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert, nach 15 min Einwirkungszeit 3 x mit PBS-A gewaschen und 1 h mit Osmiumtetroxid nachfixiert. Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Flaschen in Epon eingebettet und bei 37°C gehärtet.

2.3. Gewebezüchtung

2.3.1. Etablierung

Zur in-vitro-Anzüchtung wurde das Gehirn steril entnommen und Stückchen des neoplastischen Gewebes unter sterilen Bedingungen in Petri-Schalen mit PBS-A gewaschen. Nach Zerkleinerung des Tumormaterials in ca. 1 mm^3 grosse Stücke wurden diese in Plastikflaschen (Nunc(R) 1460, Roskilde, Dänemark) explantiert. Als Anzuchtmedium dien-

te Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco Grand Island, NY, USA, Cat. No 430-2100) mit 20% fetalem Kälberserum (FKS), Antibiotika (100 I.E. Penicillin/ml, 100 µl Dihydrostreptomycin/ml, 65 I.E. Neomycinsulfat/ml) und 10 ml einer 8,8%igen $NaHCO_3$-Lösung/l, welches nach Antrocknen der Gewebestückchen vorsichtigt zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden im geschlossenen System bei 37°C bebrütet.

2.3.2. Subkultivierung

Die Herstellung von Subkulturen erfolgte nach der Trypsinierungsmethode. Das Medium wurde abgegossen, der dichtbewachsene Zellrasen mit STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versene, MARCUS et al., 1956) vorgewaschen und anschließend mit 2 ml STV überschichtet. Nach einer 5 min langen Inkubation bei 37°C im Brutschrank löste sich der Zellrasen durch STV-Wirkung von der Unterlage. Die Zellen wurden in DMEM suspendiert, je nach Proliferationsgeschwindigkeit der Zellinie im Verhältnis 1:2 bis 1:50 geteilt und auf neue Kulturgefäße (Nunc(R)-Plastikflaschen, 1470) übertragen.

Als Kultivationsmedium wurde DMEM unter Zugabe von 10% FKS verwendet.

2.3.3. Klonierung

Aus der Zellinie 78FR-G-219 wurden drei Zellklone, jeweils in der 10., 20. und 40. Passage, isoliert. Dazu wurden die Zellen in möglichst hoher Verdünnung ausgesät. Nach Auswachsen sichtbarer Zellkolonien erfolgte eine Isolierung der einzelnen Klone mittels Trypsinierung (STAVROU et al., 1979). Ein 5 mm hoher Metallzylinder wurde vorsichtig unter sterilen Bedingungen auf die in Frage kommende Kolonie aufgesetzt und mit einigen Tropfen STV-Lösung gefüllt. Wenige Minuten später wurden die Zellen mit einer Eppendorf-Pipette aufgezogen und in neue Kulturgefäße überführt. Nach dreimaliger Subklonierung wurden die Subklone wieder als Kultur (78FR-G-219C_{1-3}) weitergezüchtet.

2.3.4. Konservierung

Alle zwei Monate wurden Zellen unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -85°C eingefroren (ASHWOOD-SMITH, 1961; DOUGHERTY, 1962). $2x10^6$ Zellen/ml in DMEM mit 20% FKS wurden mit 10% DMSO versetzt, in 1 ml-Portionen in Plastikgefäße abgefüllt und 4 h bei 4°C gelagert, um eine Penetration des DMSO zu gewährleisten. Anschliessend wurden die Zellen bei -85°C eingefroren. Das Wiederanzüchten der Zellen erfolgte nach einem schockartigen Auftauen (1 min) in DMEM mit 20% FKS. Zur Entfernung möglicher DMSO-Reste war ein Mediumwechsel nach 24 h notwendig.

2.4. Gliazellkulturen

Die für Absorptions- und Kontrollzwecke bei den Immunisierungsversuchen benötigten Hirnzellen fetaler (15. Tag der Trächtigkeit), neugeborener und erwachsener Ratten wurden jeweils über ca. 10 Passagen in der Kultur gehalten. Der Explantierung von Gewebestückchen der Großhirnhemisphären folgte die Bebrütung im geschlossenen System bei 37°C. Als Medium diente während der gesamten Kultivationsdauer M 199 (Hanks) einschließlich 20% FKS, 10 ml einer 8,8%igen $NaHCO_3$-Lösung/l, 100 I.E. Penicillin/ml, 100 µg Dihydrostreptomycin/ml und 65 I.E. Neomycinsulfat/ml.

3. Gliaspezifische Proteine

Der Nachweis der gliaspezifischen Proteine S-100* und GFAP** erfolgte durch die indirekte Immunofluoreszenz-Technik (Sandwich-Technik nach COONS et al., 1957). Subkonfluente "cover-slips" wurden 3 x in PBS-A gewaschen, 3 min mit kaltem Aceton fixiert, mit Anti-S-100 oder Anti-GFAP (1:16) vom Kaninchen überschichtet und nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Lamellen 3 x in PBS-A gewaschen, getrocknet und weitere 30 min bei 37°C mit

---

* S-100 = "soluble in 100% ammoniumsulfate"

** GFAP = "glial fibrillary acidic protein"

Fluoresceinisothiocyanat-gekoppeltem Anti-Kaninchen-Globulin vom Schaf (Verdünnung 1:32; Meloy Laboratories, Springfield, Ill., USA) inkubiert. Die Präparate wurden anschließend 3 x in PBS-A gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingeschlossen. Als Kontrollen dienten Lamellen, die nur mit dem Konjugat, mit normalem Kaninchenserum oder mit den entsprechenden Antigenen absorbierten Kaninchenantiseren inkubiert wurden. Die Isolierung der gliaspezifischen Antigene sowie die Gewinnung der Antiseren wurde von HAGLID und STAVROU (1973) beschrieben.

4. Tumorogenität

Durch regelmäßig durchgeführte intracerebrale bzw. subkutane in vivo-Passagen wurde die Tumorogenität der in vitro etablierten Tumoren getestet und die zum Angehen eines Tumors erforderliche Mindestzellzahl ermittelt.

Die Zellen wurden als dichtgewachsene Monolayer-Kulturen abtrypsiniert, bei 800 U/min zentrifugiert, in PBS-A resuspendiert, auf die benötigte Zahl eingestellt und sofort appliziert.

Für die intracerebralen Inokulationen wurden $1x10^6$ Tumorzellen in 0,1 ml PBS-A verwendet. Diese wurden 2-3 Wochen alten Ratten paramedian in einem 45^o Winkel mit rostraler Injektionsrichtung ins Großhirn appliziert. Die entstandenen Hirntumoren wurden z.T. in vitro explantiert und als Kultur weitergeführt.

Zur Induktion subkutaner Transplantationstumoren erhielten 8-10 Wochen alte Ratten $10x10^6$ - $20x10^6$ Zellen in 0,2 ml PBS-A subkutan zwischen die Schulterblätter. Die Wachstumscharakteristika der transplantierten Tumoren wurden durch Beobachtungen in vivo erfaßt und die humoralen Reaktionen der tumortragenden Tiere mit Hilfe von in-vitro-Tests untersucht. Gelegentlich erfolgte auch eine Anzüchtung von subkutanen Transplantationstumoren in der Kultur.

5. Immunisierungen

5.1. Ratten

5.1.1. Zellen

Immunisierungsversuche bei Ratten wurden mit unbehandelten und chemisch modifizierten Gliomzellen der Kulturen 78FR-G-219, 78FR-G-219C_3, 78FR-G-284, 78FR-G-299 und 78FR-G-344 durchgeführt. Als Kontrollen dienten normale Hirnzellen. Nach drei Applikationen chemisch modifizierter Tumorzellen erhielten die Tiere eine Boosterung mit nativen Tumorzellen (Tab. I), die je nach Tumorogenität der Kultur bis zu $10x10^6$ Zellen enthielt.

5.1.2. Chemische Modifikation

Die Modifikation der für die Immunisierungen verwendeten Zellen erfolgte mit Dimethylsulfat (STAAB und ANDERER, 1976 und 1977) bzw. mit "trinitrobenzenesulfonic acid" (TNBS, LEMONNIER et al., 1977). Die benötigte 50 mM Dimethylsulfatlösung (DMS) in PBS-A (pH 7,3) war mit 5% Äthanol und 5% Glycerol versetzt. Zur Herstellung einer 10 mM TNBS-Lösung wurden 0,2932 g TNBS in 100 ml eines 0,05 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,4) gelöst.

Mechanisch geerntete Zellen aus dichtgewachsenen Monolayerkulturen wurden 3 x in eiskaltem PBS-A gewaschen und auf eine Zellzahl von $5x10^6$/0,1 ml eingestellt. 0,1 ml der Zellsuspension wurde mit 0,1 ml der TNBS- bzw. 1 ml der DMS-Lösung vermischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach 3 x Waschen in eiskaltem PBS-A wurden die Zellen resuspendiert und auf die zur Immunisierung erforderliche Zellzahl gebracht.

Die Lebensfähigkeit der modifizierten Zellen wurde in verschiedenen Stadien des Modifikationsvorgangs durch die Trypan-Blau-Exklusionsmethode getestet. Die Überwachung der Vermehrungsfähigkeit erfolgte im Kulturgefäß unter Standardbedingungen.

5.1.3. Immunisierungsprotokolle

Die verschiedenen Immunisierungsschemata sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I

Immunisierung syngener Ratten mit verschiedenen Antigenpräparationen

Immunisierungsgruppe	Zellantigen/ Reagenz	Immunisierungstag
I	$0,5\text{-}1 \times 10^6$ Gliomzellen + DMS	1, 8, 15
	$0,5\text{-}1 \times 10^6$ Native Gliomzellen	29
II	1×10^6 Gliomzellen + DMS	1, 15, 36
	1×10^6 Native Gliomzellen	50
III	1×10^6 Gliomzellen + DMS + CFA	1, 8, 15
	1×10^6 Native Gliomzellen	29
IV	1×10^6 Gliomzellen + TNBS	1, 8, 15
	1×10^6 Gliomzellen + DMS	29
V	1×10^6 Gliomzellen + TNBS	1, 8, 15
	$1\text{-}10 \times 10^6$ Native Gliomzellen	29
VI	1×10^6 Native Gliomzellen	1, 8, 15
	$1\text{-}10 \times 10^6$ Native Gliomzellen	29
VII	1×10^6 Hirnzellen + TNBS	1, 8, 15
	$1\text{-}10 \times 10^6$ Native Hirnzellen	29

DMS = Dimethylsulfat
CFA = Complettes Freund'sches Adjuvans
TNBS = "trinitrobenzenesulfonic acid"

5.1.4. Applikationsform

Die vorbereitete Zellsuspension in 0,2 ml PBS-A wurde den Ratten sofort subkutan an wechselnden Körperstellen injiziert. Die erste Inokulation erfolgte zwischen den Schulterblättern, die zweite auf der linken, die dritte auf der rechten Seite des Abdomens. Die Boosterung mit nativen Zellen - 14 Tage nach der letzten Applikation - fand wieder zwischen den Schulterblättern statt.

5.2. Kaninchen

Um xenogene Antiseren zu erhalten, wurden männliche Kaninchen wie folgt immunisiert:

Am Tag 1 wurde den Tieren eine Emulsion von 100×10^6 Zellen in 3 ml PBS-A und 10% complettem Freund'schen Adjuvans (Gibco, Grand Island, NY, USA) subkutan appliziert. Mit der gleichen Zellzahl, jedoch ohne Adjuvans, fand am Tag 21 und am Tag 23 eine Wiederholungsimmunisierung statt. Am Tag 30 wurde intramuskulär mit 150×10^6 Zellen in PBS-A geboostert.

6. Seren

6.1. Serumgewinnung

6.1.1. Ratten

Den Ratten wurde kurz vor Versuchsbeginn und dann wöchentlich 0,5-1 ml Blut durch Herzpunktion entnommen, 1 h bei Raumtemperatur, 1 h bei 4°C gelagert und anschließend 20 min bei 4000 U/min bei 4°C zentrifugiert.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Seren in Portionen von 50-100 µl bei -85°C aufbewahrt.

6.1.2. Kaninchen

Vor Beginn der Immunisierung und am 33., 36. und 40. Tag nach Immunisierungsbeginn wurde von den Kaninchen 5-10 ml Blut durch Herzpunktion gewonnen. Das Serum wurde gepoolt und bei -85°C eingefroren.

6.1.3. Komplement

Als Komplementquelle für den Mikrocytotoxicitäts-Test (MCT) diente das Serum ausgewählter unbehandelter Kaninchen. Als geeignet wurde das Komplement befunden, das in möglichst niedriger Verdünnung die geringste spontane Cytotoxicität aufwies, aber zusammen mit dem Antiserum den höchsten cytotoxischen Titer zeigte (STAVROU et al., 1978a). Für den Immun-Adhärenz-Test wurde lyophilisiertes Meerschweinchenkomplement (Behringwerke AG, Marburg) verwendet.

6.2. Absorptionen

Die Absorption syngener Testseren mit verschiedenen Materialien erfolgte vor der Verwendung der Seren in den in-vitro-Untersuchungen zum Nachweis deren Spezifität.

6.2.1. Zellen

Das Serum tumortragender und gliomimmunisierter Ratten wurde mit Hirnzellkulturen fetaler (Gehirn am 15. Tag der Trächtigkeit entnommen), neugeborener und erwachsener Ratten, mit TNBS-modifizierten Hirnzellen sowie mit den entsprechenden Gliomzellinien wie folgt absorbiert:

a) 1 ml Serum wurde mit $5x10^6$ Zellen suspendiert, 30 min bei 4^oC inkubiert, anschließend bei 1000 U/min abzentrifugiert und wieder mit $5x10^6$ Zellen absorbiert. Insgesamt erfolgten vier Durchgänge.

b) 100 µl Serum wurden mit $5x10^6$ Zellen 30 min bei 37^oC unter gelegentlichem Suspendieren inkubiert, dann über Nacht bei 4^oC weiter absorbiert.

6.2.2. FKS

Zur Entfernung eventuell enthaltener Anti-FKS Immunglobuline (LIAO et al., 1979) wurden die Gliomantiseren mit unlöslichem FKS in Anlehnung an die Angaben von AVRAMEAS und TERNYNCK (1969) absorbiert.

10 ml FKS wurden in einem Dialysierschlauch über Nacht bei 4^oC gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert.

Mit einem 1 M Natrium-Azetat-Puffer wurde der pH-Wert des dialysierten Serums auf pH 5 eingestellt. 3 ml einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung in PBS wurden tropfenweise dem dialysierten FKS zugegeben. Das sich langsam bildende Gel wurde ca. 6 h bei Raumtemperatur belassen. Das Gel wurde 30 sec bei 1500 U/min gepottert, dann 3 x mit PBS gewaschen, wobei jeweils 15 min lang bei 4000 U/min abzentrifugiert wurde. Bis zur Verwendung wurde das Gel bei 4°C aufbewahrt.

Zur Absorption wurden gleiche Anteile Gel und Serum gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C über Nacht weiter absorbiert.

7. Immunologische Untersuchungstechniken zum Nachweis humoraler Gliomantikörper

7.1. Immunofluoreszenz-Test

Die Darstellung fluoreszierender Antikörper in den Seren von Tumorträgern und immunisierten Tieren geschah mit der gleichen Technik wie bei dem S-100- und GFA-Nachweis. Die Immunseren wurden in der Verdünnungsreihe bis zu 1:64 getestet, das Konjugat - ein Ziegen-Anti-Ratten-Globulin markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (Cappel Laboratories, Cocbrainville, Pa., USA) - in der Verdünnung von 1:32 verwendet.

7.2. Mikrocytotoxicitäts-Test

Der in-vitro-Nachweis komplementabhängiger cytotoxischer Antikörper erfolgte durch den Mikrocytotoxicitäts-Test (AMOS et al., 1969; GÖTZE et al., 1972; STAVROU et al., 1978a).

Mechanisch abgelöste Zellen wurden schonend in Medium suspendiert und auf eine Zellzahl von 5 x 10^5/ml eingestellt. In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte nach TERASAKI (Nunc$^{(R)}$) wurde mit der Hamiltonspritze 2/ul der Zellsuspension (ca. 1000 Zellen) gebracht und nach 10 min 2/ul des Antiserums hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde ein Tropfen Medium pro Vertiefung aufgetragen, 10 min später dekantiert und jeweils 2/ul des zuvor ausgetesteten Kaninchenkomplements hinzugefügt. Die geschlossenen Platten wurden 30 min bei 37°C inkubiert, dann 5 min bei 4°C abgekühlt. Ein Tropfen Formalin (6%ig, angesetzt mit 0,9%iger NaCl-Lösung) wurde als Fixativ auf jede Vertiefung aufgetragen bevor die Platten mit einem Deckglas abgedeckt und im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop bei 160facher Vergrößerung ausgewertet wurden.

Negative Kontrollen enthielten entweder Zellen und Medium allein, Zellen, Medium und Komplement oder Zellen, Medium, Komplement und gepooltes Nullserum (Cytotoxicität bis 20%).

Die positive Kontrolle wurde mit 1:100 verdünntem Kaninchen-Anti-Ratten-Serum und Komplement durchgeführt (Cytotoxicität 100%).

Von 100 pro Vertiefung ausgezählten Zellen wurde der Prozentsatz lebender Zellen ermittelt und das Ergebnis als

cytotoxischer Index (C.I.) ausgedrückt (WOOD und MORTON, 1970; KORNBLITH et al., 1974), der wie folgt berechnet wurde:

$$C.I. = 1 - \frac{\text{\% vitale Zellen im Test}}{\text{\% vitale Zellen in der Kontrolle}}$$

Lebende Zellen besaßen einen hellen Randsaum und erschienen dreidimensional, während tote Zellen dunkel waren und ihren Zellkern deutlich erkennen ließen. Zellen, die in ihrem Erscheinungsbild zwischen den beiden Kriterien lagen, wurden zu den toten gezählt.

Die Seren wurden vor dem Test regelmäßig 30 min lang in einem Wasserbad bei 56°C erhitzt, um eine mögliche cytotoxische Wirkung des Rattenkomplements auszuschließen.

7.3. Immun-Adhärenz-Test

Der Immun-Adhärenz-Test wurde an subkonfluenten Monolayer-Kulturen in Mikrotiterplatten nach TERASAKI durchgeführt (TACHIBANA und KLEIN, 1970; COAKHAM et al., 1980). Die Zellen wurden 18 h vor Versuchsbeginn mit dem Hamilton-Dispenser ausgesät (ca. 1000 Zellen pro Vertiefung), nach ihrem Absetzen (30 min bei 37°C) mit 20% FKS enthaltendem DMEM überschichtet und bis zur Verwendung im geschlossenen System bei 37°C inkubiert. Zu Beginn des Testes wurden die Platten auf geeignete Zahl und Konfiguration der Zellen kontrolliert bevor sie 2 min lang vorsichtig mit "Hanks Basic Salt Solution" bei Raumtemperatur gewaschen wurden. Zur Verdünnung des Anti-

serums wurde "Veronal Buffered Medium" (VBM; NaCl 137 mM, KCL 5,7 mM, $CaCl_2$ 0,15 mM, $MgCl_2$ 0,05 mM, Veronal 3,1 mM, Na-Veronal 1,8 mM, Glukose 5,6 mM) benutzt. 10/ul Antiserum in verschiedenen Verdünnungen wurden pro Vertiefung zugefügt, anschließend folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei 37°C, dann wurden die Platten 5 min bei 4°C abgekühlt. Die Zellen wurden 2 min schonend mit VBM bei Raumtemperatur gewaschen bevor 10/ul einer 0,1%igen menschlichen Erythrocytensuspension unter Zusatz von 2,5% Meerschweinchenkomplement hinzugegeben wurde (ca. $2,5 \times 10^4$ Erythrocyten/10/ul). Die Herstellung der Indikatorlösung erfolgte immer kurz vor dem Test. Dazu wurden 500/ul Erythrocyten (menschliche Erythrocyten der Blutgruppe O Rh+ mit gleichem Volumen Alsever's Lösung bei 4°C aufbewahrt) in 10 ml eiskaltem VBM-EDTA (NaCl 145 mM, Veronal 3,1 mM, Na-Veronal 1,8 mM, EDTA 0,5 mM) suspendiert, bei 1800 U/min 10 min abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3 x mit kaltem VBM wiederholt. 10/ul des Pellets wurden in 10 ml VBM suspendiert. Zu 4 ml dieser 0,1%igen Erythrocytensuspension kamen 100/ul Meerschweinchenkomplement (= 2,5%ige Komplementkonzentration). Nach 30 min bei 37°C wurden die Platten vorsichtig umgedreht, so daß die Bodenfläche nach oben zeigte. In dieser Lage wurde weitere 60 min inkubiert, damit die Erythrocyten, die sich nicht angelagert hatten, vom Boden der Vertiefung zum tiefliegendsten Punkt des Tropfens sinken konnten. Danach wurde mit einem saugfähigen Papiertuch die Flüssigkeit behutsam entfernt und die Platte mit eiskaltem VBM aufgegossen. Die Auswertung des Testes erfolgte im Phasenkontrastmikroskop bei 160facher Vergrößerung.

Zellen mit drei oder mehr angelagerten Erythrocyten wurden als positiv angesehen. Der Prozentsatz positiv reagierender Zellen pro Vertiefung wurde ermittelt.

Zu jedem Experiment wurden 2 negative Kontrollreihen durchgeführt, bei welchen es zu weniger als 5% "Rosettenbildungen" kam. Eingesetzt wurden gepooltes Normalserum unbehandelter Tiere und VBM. Als positive Kontrolle diente Kaninchen-Anti-Rattengliom-Serum in der Verdünnung von 1:300 - 1:500.

II. Ergebnisse

1. Lichtmikroskopie

1.1. Tumoren

Histologisch zeigten alle Tumoren in unterschiedlichem Ausmaß vielgestaltige Zellformen, zahlreiche Mitosen, riesenzellähnliche Erscheinungen, Gefäßbildungen und straßenartige Nekrosen. Die Mischgliome (78/284 und 78/344) bestanden aus astrocytären und oligodendrocytären Komponenten, die von Areal zu Areal in wechselndem Verhältnis auftraten. Das pleomorphe Gliom (78/219) war von einer ausgeprägten Zell- und Kernpleomorphie gekennzeichnet und enthielt auch astrocytenähnliche Zellen mit mehreren deutlichen Fortsätzen (Abb. 1a). Im Zellverband des Tumors 78/299 dominierten astrocytäre Elemente mit langen Fortsätzen, die in lockerer Anordnung nebeneinander lagen.

Der morphologische Befund über die intracerebralen und subkutanen Transplantationstumoren stimmte im wesentlichen mit den morphologischen Charakteristika der jeweiligen Primärtumoren überein, allerdings waren bei den subkutan gewachsenen Tumoren vermehrt bindegewebiges Stroma, nekrotische Areale und Mitosefiguren bzw. riesenzellähnliche Bildungen festzustellen.

1.2. Zellkulturen

Die vier kultivierten Gliome zeichneten sich in vitro durch ein besonders schnelles Wachstum aus. Die hohe Proliferationsgeschwindigkeit blieb auch noch nach vielen Subkulturen konstant. Bis etwa zur 10. Passage zeigten die kultivierten Zellen unterschiedliche morphologische Variationen. Neben schlanken bipolaren Zellelementen waren auch großflächige polygonale Zellen sowie vielkernige Riesenzellen in wechselnder Verteilung vorhanden. Mit zunehmender Passagerate wurden die Zellpopulationen einheitlicher. Bi- und multipolare Zellen dominierten auch nach längerer Kultivationsdauer, während die Zahl der flachen, eher rundlichen Zellen nach und nach abnahm, ohne jedoch in allen Kulturen ganz zu verschwinden (Abb. 1b-d, 2a).

Die Kultur 78FR-G-219C_3 setzte sich fast ausschließlich aus cytoplasmareichen multipolaren Zellen zusammen, deren bohnenförmiger Kern meistens exzentrisch gelagert war.

Die aus intracerebralen und subkutanen Transplantationstumoren etablierten Zellinien zeigten in ihrer Morphe keine bemerkenswerte Unterschiede gegenüber den Ursprungskulturen. Bi- oder multipolare Zellen mit langen Fortsätzen waren in der Überzahl.

Mit zunehmender Kultivationszeit war bei allen Zellinien eine mehr oder weniger ausgeprägte Reduktion der Zellfortsätze zu beobachten. Dieser Prozess vollzog sich langsam fortschreitend ab der 50.-100. Passage.

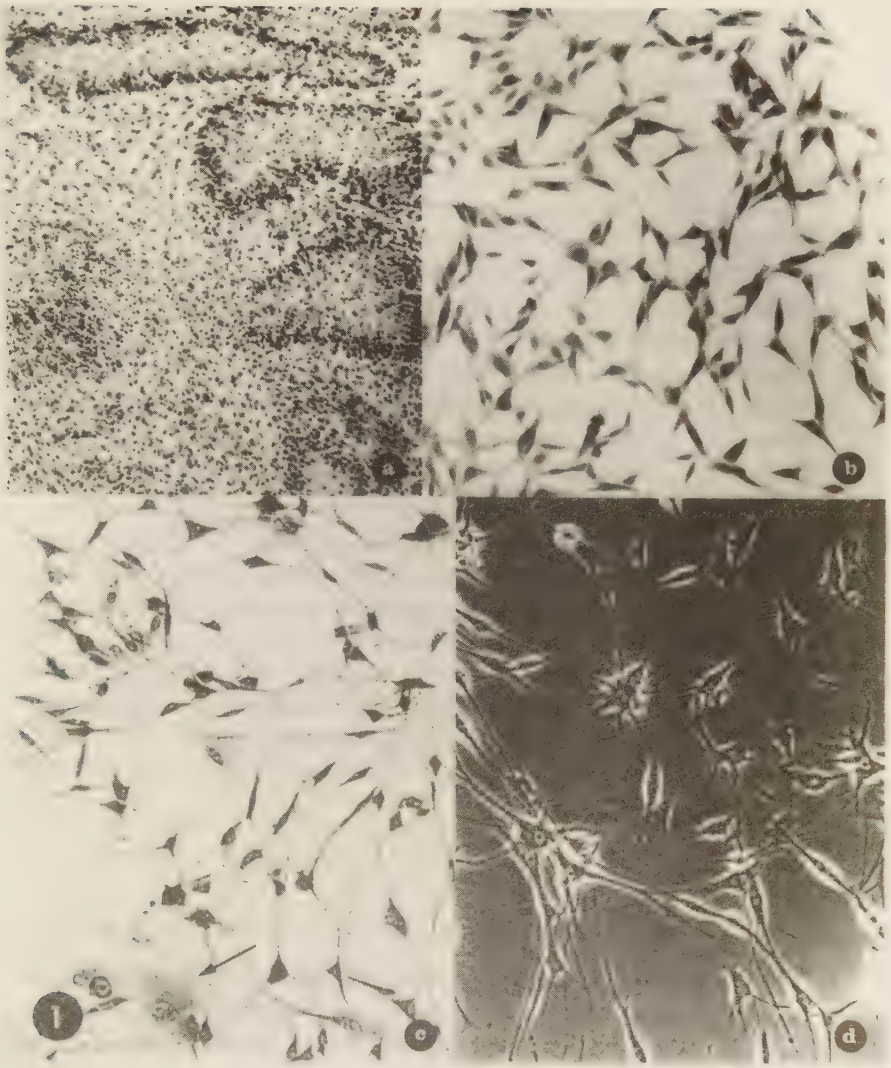

Abb. 1: Experimentell induziertes pleomorphes Gliom (78/219,a) mit straßenartigen Nekrosen und die daraus etablierte permanente Kultur (78FR-G-219, 60.Passage, b) mit bi- bzw. multipolaren Zellen.
Subkonfluente, permanente Kultur (78FR-G-299, 55. Passage) des Astrocytoms (78/299) mit überwiegend sternförmigen Zellen (c, d) und vereinzelten fibroplastoiden Zellen (c, ⟶).
(a-c,HE-Fbg., a x 120, b,c x 200; d, Phasenkontrast x 160).

2. Elektronenmikroskopie *

2.1. Tumoren

Elektronenmikroskopisch zeigten die vier Gliome und ihre Transplantate viele Gemeinsamkeiten.

Die Einzelzellen ließen unregelmäßig geformte Kerne - oft mit tiefen Einbuchtungen - erkennen. Die Zellkerne enthielten gewöhnlich einen, manchmal zwei Nucleoli und lagen bisweilen exzentrisch. Das Chromatin war regelmäßig entlang der Kernmembran und im Karyoplasma angeordnet. Ein breiter Cytoplasmasaum von geringer bis mittlerer Elektronendichte umgab die Kerne. In unterschiedlichem Ausmaß waren Cytoplasmaorganellen wie rauhes endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, freie Ribosomen und Golgi-Zonen vorhanden. Ferner konnten Mikrofilamente, teilweise in parallelen Zügen, teilweise ungeordnet, im Cytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen werden. In einigen Zellen waren regelmäßig elektronendichte, intracytoplasmatische Strukturen zu finden, die in vieler Hinsicht an Partikel erinnerten, die in normalen Astrocyten beobachtet worden sind (GAMBETTI et al., 1975).

---

* Herrn Dr. A.P. Anzil, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, bin ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

2.2. Zellkulturen

Die sowohl aus den Primärgliomen als auch aus den Transplantationstumoren etablierten Zellinien ähnelten sich in der elektronenmikroskopischen Darstellung sehr.

Die Charakteristika der in vitro gezüchteten Tumorzellen stimmten im wesentlichen mit den der in vivo gewachsenen Zellen überein. Jedoch konnte bei den in vitro etablierten Kulturen eine zunehmende Anzahl länglich geformter Zellen mit spindelförmigen Kernen festgestellt werden. In allen Tumorzellen war das mäßig elektronendichte Cytoplasma reich an subzellulären Strukturen. Freie Ribosomen kamen häufig vor. Feine Netze von Filamenten traten in einigen Zellen spärlicher in Erscheinung. Mikrotubuli und Zentriolen schienen in den kultivierten Zellinien in grösserer Anzahl vorhanden zu sein als in den entsprechenden in vivo gewachsenen Tumoren. Gelegentlich waren an der Zellmembran tentakelartige Mikrovilli zu erkennen.

Charakteristisch für die Kultur 78FR-G-219 war die traubenartige Anordnung der besonders großen rundlichen Mitochondrien. Auffallend breite Cristae zeichneten sich gut von der sehr elektronendichten Matrix ab.

3. Gliaspezifische Proteine

Für die meisten Zellen der in vitro etablierten Hirntumoren und für alle Zellen der Linie 78FR-G-219C_3 ergab sich eine für das S-100-Protein spezifische Fluoreszenz im Cytoplasma und an der Zellmembran. Allerdings ließen sich

von Zelle zu Zelle Unterschiede in der Fluoreszenzintensität feststellen. Am stärksten reagierten die bi- und multipolaren Zellen, während die großleibigen rundlichen Zellen sowie die riesenzellartigen Bildungen nur gering oder gar nicht fluoreszierten. Ein positiver Nachweis des GFA-Proteins konnte für eine wechselnde Anzahl von Zellen der Kulturen 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-344 erbracht werden. Die Zellen der Kulturen 78FR-G-299 und 78FR-G-219C_3 reagierten insgesamt positiv, wenn auch in unterschiedlicher Stärke (Abb. 2b).

4. Tumorogenität

4.1. Tumortransplantation

Eine intracerebrale oder subkutane Transplantation von $1x10^6$ bzw. $10x10^6$ Zellen der untersuchten Zellinien führte bei syngenen Ratten schon nach 1 - 4 Wochen zum Entstehen von Tumoren an der Inokulationsstelle. Die Latenzzeit variierte je nach Zellinie und stand in engem Zusammenhang mit der Passagerate der jeweiligen Kultur. Mit zunehmender Kultivationsdauer ließ die Tumorogenität nach, so daß ab der 30. - 50. Subkultur die errechnete Mindestzellzahl oft nicht mehr ausreichte und die Dosis erhöht werden mußte. Durch in vivo/in vitro-Wechselpassagen konnte die ursprüngliche Tumorogenität der Zellinien jedoch wiedererlangt bzw. beibehalten werden.

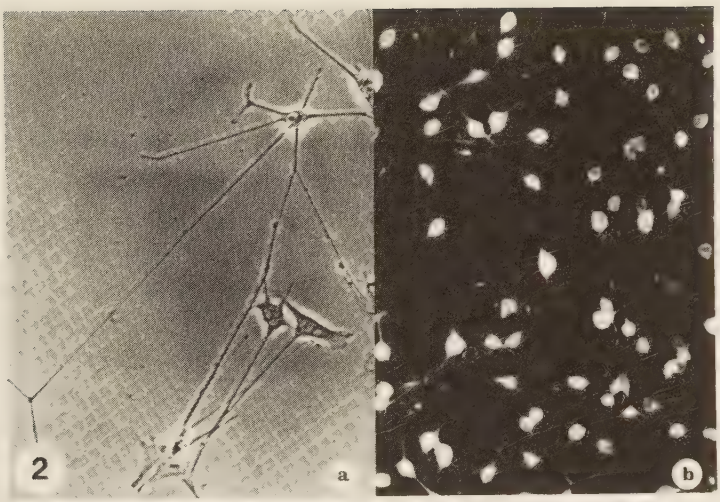

Abb. 2: Astrocyten der permanenten Zellinie 78FR-G-299 mit langen, teilweise verzweigten Fortsätzen (a), die eine positive Reaktion bei der cytochemischen Darstellung des S-100-Proteins zeigen (b). (a, Phasenkontrast, x 160; b, Immunofluoreszenz, x 200).

4.2. Tumorwachstum

Meist schon 14 Tage nach einer intracerebralen Transplantation zeigten die Tiere durch abnormes Verhalten Anzeichen eines intracerebralen Tumorwachstums. Bei der Sektion fand sich eine im Großhirn und in den Seitenventrikeln lokalisierte gräulich-weiße, glasige Tumormasse.

Das subkutane Tumorwachstum der geprüften Kulturen vollzog sich nach einer unterschiedlichen Latenzzeit annähernd linear.

Bei den Kulturen 78FR-G-219 und 78FR-G-299 ließen sich schon 7-14 Tage, bei den anderen Zellinien erst 14-28 Tage nach der subkutanen Transplantation derbe, knotige Gebilde von 0,5-1,0 cm Durchmesser (1 g) an der Inokulationsstelle palpieren. Eine Woche später erreichten diese Tumoren eine Größe von 1-1,5 cm Durchmesser und ein Gewicht von 3,5 g. Innerhalb der nächsten 7 Tage wuchsen die Neoplasien zu 8 g schweren rundlich-ovalen Umfangsvermehrungen (3x1x1 cm) heran, die im Laufe einer weiteren Woche ca. 5x2x2 cm (14,5 g) groß wurden.

Die subkutanen Transplantationstumoren aller Gliomzelllinien hatten eine grau-weiße Farbe und waren von weicher bis derber Konsistenz. Mit zunehmender Tumorgröße neigten sie zur Cystenbildung. Diese Erscheinung fiel besonders bei den mit der Zellinie 78FR-G-299 erzeugten Transplantationstumoren auf.

In den Anfangsstadien waren die Tumoren gut abgekapselt und zeigten ein expansives Wachstum, während sie sich in den späteren Stadien oft infiltrativ in das umliegende Gewebe ausdehnten. Bei diesen Tumoren wurden nach operativer Entfernung Rezidivbildungen beobachtet.

Mit zunehmender Größe der Tumoren wurden auch Metastasenbildungen in den regionären Lymphknoten, sowie in dem Brust- und Bauchraum histologisch nachgewiesen.

4.3. Tumorregression

Bei der Zellinie 78FR-G-219 kam es in 45% der Fälle zu einer spontanen Regression der entstandenen subkutanen Transplantationstumoren. Diese erreichten vor ihrer Zurückbildung meistens nur einen Durchmesser von 1 cm. Transplantationstumoren der anderen untersuchten Gliomzellkulturen wuchsen immer progredient.

5. Humorale Gliomantikörper

5.1. Immunofluoreszenz-Test

In allen Kulturen wurde mit dem Antiserum tumortragender und immunisierter Tiere eine spezifische Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität sowohl im Cytoplasma als auch an der Zellmembran nachgewiesen. Zwischen den Zelllinien 78FR-G-219, 78FR-G-219C_3, 78FR-G-299 und 78FR-G-344 war eine eindeutige Kreuzreaktion festzustellen. Die stärkste Immunofluoreszenz wurde allerdings immer durch die Reaktion der Zellen mit den jeweiligen primär gegen diese gerichteten Antiseren hervorgerufen. Das Reaktionsprodukt stellte ein granuläres gelblich-grünes Material dar, das ungleichmäßig verteilt an und in der Zelle vor-

lag. Die fluoreszierenden Strukturen bildeten bei vielen der positiv reagierenden Zellen traubenartige Anhäufungen an einigen Stellen der Zellmembran. Innerhalb einer Kultur wechselte der Grad der Fluoreszenzintensität von Zelle zu Zelle. Riesen- und Monsterzellen zeigten im Vergleich zu den anderen Zellen die schwächste Fluoreszenz (Abb. 5 a-b).

5.2. Mikrocytotoxicitäts-Test (MCT)

5.2.1. Seren immunisierter Tiere

Die Modifikation der zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen mit DMS oder TNBS führte bei allen Immunisierungsverfahren zur Steigerung der cytotoxischen Eigenschaften der gewonnenen Antiseren, jedoch wurde der Cytotoxicitätsgrad von der angewandten Immunisierungsmethode und Antigenmenge bestimmt (Tab. II). Die Immunisierung mit DMS-behandelten Gliomzellen der Kultur 78FR-G-219C_3 (Tab. I, Immunisierungsgruppe I) ergab eine nur unwesentliche Steigerung der Cytotoxicität (C.I. = 0,23$\pm$ 0,03) gegenüber der mit nativen Zellen immunisierten Kontrollgruppe (C.I. = 0,20$\pm$ 0,03). Effektiver erwies sich die bei der Gruppe II angewandte Immunisierungsmethode (Tab. I), bei der in den Seren der Tiere ein durchschnittlicher cytotoxischer Index von 0,36 $\pm$ 0,05 ermittelt wurde. Nahezu gleich hoch (C.I. = 0,32 $\pm$ 0,03) war der cytotoxische Titer der Tiere der Immunisierungsgruppe III (Tab. I), die Inokulationen von DMS-modifizierten Gliomzellen der Kultur 78FR-G-219 mit CFA erhalten hatten.

Tabelle II

Humorale Cytotoxicität nach verschiedenen Immunisierungsmethoden
(Boosterung mit $1x10^6$ Zellen)

Immunisierungs-Gruppe/Chemische Modifikation	Antigen	Subkultur	Behandelte Ratten/ Tumorfreie Ratten	Cytotoxischer Index	
				absorbiert (fetale Rattenhirnzellen)	unabsorbiert
I/DMS	78FR-G-219C_3	15.-32.	10/4	0,21 (± 0,02)	0,23 (± 0,03)
II/DMS	78FR-G-219C_3	30.-36.	10/10	0,32 (± 0,03)	0,36 (± 0,05)
III/DMS + CFA	78FR-G-219	52.-56.	10/0	0,30 (± 0,03)	0,32 (± 0,03)
IV/TNBS	78FR-G-219	58.-64.	10/10	0,35 (± 0,04)	0,39 (± 0,02)
V/TNBS	78FR-G-219	60.-66.	48/48	0,41 (± 0,02)	0,45 (± 0,04)
VI/Native	78FR-G-219	15.-30.	10/10	0,18 (± 0,01)	0,20 (± 0,03)

Eine beträchtliche Erhöhung des cytotoxischen Index wurde durch TNBS-Modifizierung der Tumorzellen erreicht (Tab. II). Die Immunseren der Tiere der Gruppe V (Tab. I) zeigten mit dem Titer von C.I. = 0,45 $\pm$ 0,04 die vergleichbar höchste cytotoxische Aktivität. Nicht ganz so stark cytolytisch (C.I. = 0,39 $\pm$ 0,02) wirkten die Antiseren der Ratten, die mit TNBS-modifizierten Zellen immunisiert und mit DMS-behandelten Zellen geboostert worden waren (Tab. I, Gruppe IV).

Nach Immunisierung mit nativen Gliomzellen waren in allen Antiseren gegenüber der als Antigen verwendeten Zellinie cytotoxische Aktivitäten festzustellen. Die Modifizierung der Zellen mit TNBS (Boosterung mit $1x10^6$ nativen Gliomzellen) hatte bei allen untersuchten Gliomen eine Erhöhung des cytotoxischen Index um mindestens das doppelte zur Folge (Tab. III). Der cytotoxische Titer variierte jedoch sowohl nach Immunisierung mit nativen Zellen als auch nach Immunisierung mit TNBS-behandelten Zellen von Zellinie zu Zellinie. Die stärkste Cytotoxicität wiesen in beiden Fällen die Seren der mit der Zellinie 78FR-G-344 immunisierten Tiere auf (C.I. = 0,31 $\pm$ 0,02 bzw. C.I. = 0,72 $\pm$ 0,05). Die am wenigsten entwickelten cytotoxischen Eigenschaften (C.I. = 0,13 $\pm$ 0,02 bzw. C.I. = 0,33 $\pm$ 0,02) zeigte die Zellkultur 78FR-G-284 (Tab. III).

Durch Boosterung mit $10x10^6$ nativen Gliomzellen aus hohen Passageraten wurden bei allen Zellinien noch höhere cytotoxische Werte gegenüber den als Antigenen verwendeten "targets" erzielt. Der cytotoxische Index stieg dabei um 10 - 25% gegenüber der Boosterung mit $1 x10^6$ nativen Gliomzellen an, bei der Kultur 78FR-G-$219C_3$ sogar um 45%.

Tabelle III

Vergleich der humoralen Cytotoxicität gegen verschiedene "targets" nach Immunisierung mit nativen und chemisch modifizierten Zellen ($1x10^6$ Zellen)

Nr.	Antigen/ "target"	Subkultur	Primärtumor	Cytotoxischer Index	
				Native Zellen	TNBS-modifizierte Zellen
1.	78FR-G-219	24.-28.	Pleomorphes Gliom	0,20 (± 0,03)	0,45 (± 0,04)
2.	78FR-G-219C_3	30.-38.	Pleomorphes Gliom	0,22 (± 0,02)	0,43 (± 0,05)
3.	78FR-G-284	61.-67.	Mischgliom II	0,13 (± 0,02)	0,33 (± 0,02)
4.	78FR-G-299	3.- 8.	Astrocytom I-II	0,25 (± 0,03)	0,46 (± 0,04)
5.	78FR-G-344	45.-50.	Mischgliom II	0,31 (± 0,02)	0,72 (± 0,05)
6.	Hirnzellen (syngene)	2.- 6.		0,05 (± 0,01)	0,08 (± 0,03)

Gegen native Hirnzellen syngener neugeborener Ratten gewonnene Seren konnten an Gliomzellen nahezu keine nachweisbare Cytolyse bewirken. Die Immunisierung mit TNBS-modifizierten Hirnzellen neugeborener Ratten führte zur Produktion von Antiseren, die sowohl gegen normale Hirnzellen als auch gegen Gliomzellen eine geringgradige Cytotoxicität von C.I. = 0,08 ($\pm$ 0,03) verursachten (Tab. III).

Der nach einer Immunisierung erworbene cytotoxische Titer blieb über mehrere Wochen erhöht. Bis zur zweiten Woche nach der Boosterung stieg der Antikörperspiegel, in den folgenden Wochen fiel er dann langsam ab (Abb. 3). Zwölf Wochen nach der Boosterung war kaum eine gliomcytotoxische Aktivität mehr im Serum zu registrieren.

In einigen Versuchsgruppen trat während des Immunisierungsverlaufes oder nach abgeschlossener Immunisierung Tumorwachstum auf. Diese Erscheinung fiel insbesondere nach der Immunisierung mit DMS-modifizierten Tumorzellen auf. In der Immunisierungsgruppe I (Tab. I) blieben nur 4 von 10 Tieren tumorfrei; in der Gruppe III (Tab. I) entwickelten sich bei allen 10 Ratten Tumoren an den Inokulationsstellen (Tab. II). Die Immunisierung mit TNBS-modifizierten Zellen führte in keinem Fall zum Angehen eines Tumors.

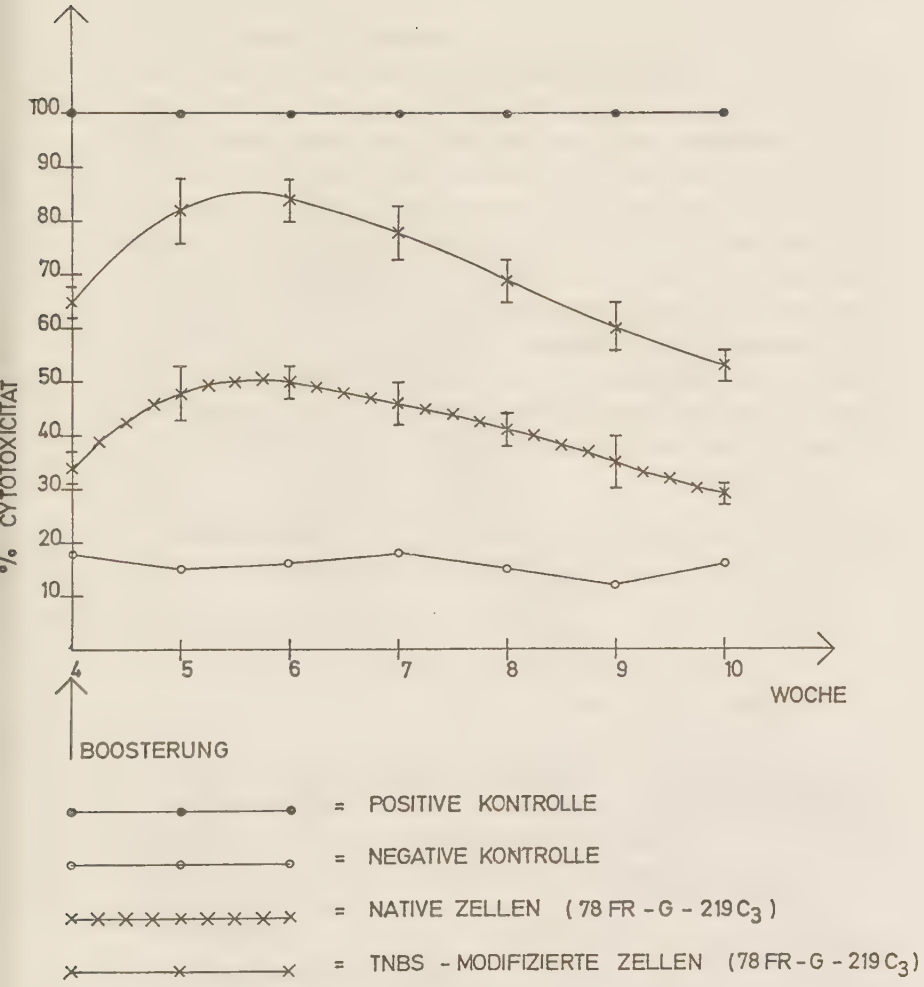

Abb. 3: Cytotoxische Aktivität im Serum nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten oder nativen Zellen der Gliomzellinie 78FR-G-219C_3.
(Boosterung 10x10^6 Zellen).

5.2.2. Absorptionen

Zur Eliminierung eventuell vorhandener cytotoxischer, nicht gegen gliomassoziierte Antigene gerichteter Antikörper, wurden die Immunseren mit syngenen Hirnzellen von Rattenfeten, von neugeborenen und erwachsenen Ratten absorbiert. Die cytolytische Aktivität der Seren nahm bei diesen Absorptionen zwischen 5 - 10% gegenüber den unabsorbierten Seren ab (Abb. 4). Durch die Absorption der Immunseren mit TNBS-modifizierten fetalen Rattenhirnzellen fiel der Antikörpertiter um 10 - 12% ab. Die Absorption der Immunseren mit den entsprechenden als Antigen verwendeten Tumorzellinien führte zu einer erheblichen Reduktion ihrer Cytotoxicität. Gliomantikörper wurden durch diese Absorption vollständig eliminiert.

Nach der Absorption mit geliertem FKS fiel der Antikörpertiter der Immunseren um durchschnittlich 5% ab.

5.2.3. Kreuzreaktionen

Die Frage des Vorkommens gemeinsamer bzw. kreuzreagierender Antigene in den vier Gliomzellkulturen wurde durch Kreuzreaktionen untersucht. Die nach Immunisierung mit TNBS-modifizierten Zellen der Kulturen 78FR-G-219, 78FR-G-284, 78FR-G-299 und 78FR-G-344 gewonnenen Seren reagierten mit jeder genannten Zellinie als "targets" positiv (Tab. IV). Die Cytotoxicität der Immunseren war in den Kreuzreaktionen fast immer niedriger als in den Reaktionen mit den jeweiligen als Antigen benutzten Kulturen.

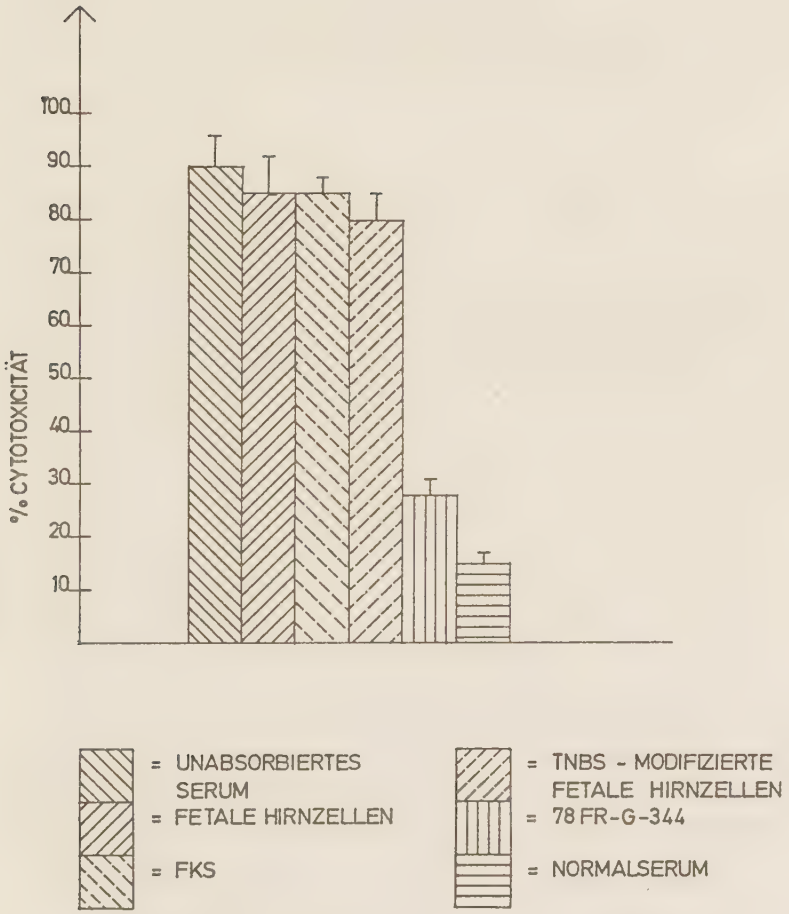

Abb. 4: Cytotoxische Aktivität eines Serums gegen TNBS-modifizierte Gliomzellen (78FR-G-344) nach Absorption mit verschiedenen Materialien.

Der Cytotoxicitätsgrad differierte jedoch von Zellinie zu Zellinie. Die Anti-78FR-G-344-Seren reagierten sowohl gegen die Zellinie 78FR-G-344 als auch gegen die anderen untersuchten Gliomzellinien als "targets" am stärksten cytolytisch (Tab. IV).

5.2.4. Seren tumortragender Tiere

Parallel mit den Immunisierungsversuchen fanden Untersuchungen zum Nachweis cytotoxischer Aktivitäten in den Seren von 60 tumortragenden Ratten statt. In allen untersuchten Seren konnten schon 7-14 Tage nach der Transplantation und im folgenden während des gesamten Beobachtungszeitraumes cytotoxische Antikörper nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Tumorgröße von 1,0 g bis 14,5 g variierte der Antikörpertiter um 35%, wobei er sich dem entsprechenden Tumorstadium gegenüber umgekehrt proportional verhielt, d.h. je mehr der Tumor an Masse zunahm, desto tiefer sank der Antikörperspiegel. Für die erste erfaßte Entwicklungsstufe, die eines Tumors von 1,0 g Gewicht, wurde der durchschnittliche Wert von C.I. = 0,39 ($\pm$ 0,04) ermittelt. Die bei einem Tumorgewicht von 3,5 g errechnete cytotoxische Aktivität des Serums betrug bei Progressortieren 0,34 ($\pm$ 0,08), während der cytotoxische Index der Regressortiere, die 2-3 Wochen nach der Tumorzellinokulation wieder tumorfrei waren, durchschnittlich bei 0,44 ($\pm$ 0,09) lag. Nach 3-4 Wochen hatten die Ratten mit progredientem Wachstum 8,0 g schwere Tumoren. Der entsprechende Cytotoxische Index ergab einen Mittelwert von 0,32 ($\pm$ 0,06). Die dem Stadium eines 14,5 g schweren Tumors entsprechenden Seren wiesen eine Gliomcytotoxicität von C.I. = 0,26 ($\pm$ 0,06) auf (Tab. V).

Tabelle IV

Kreuzreaktionen zwischen vier Gliomzellinien
(Boosterung mit $10x10^6$ Zellen)

Nr.	Antigen	"target"	Subkultur	Cytotoxischer Index
1.	78FR-G-219	78FR-G-219	26.- 30.	0,53 (± 0,05)
		78FR-G-284		0,28 (± 0,04)
		78FR-G-299		0,26 (± 0,03)
		78FR-G-344		0,32 (± 0,04)
2.	78FR-G-284	78FR-G-284	100.-106.	0,43 (± 0,06)
		78FR-G-219		0,35 (± 0,05)
		78FR-G-299		0,28 (± 0,04)
		78FR-G-344		0,23 (± 0,02)
3.	78FR-G-299	78FR-G-299	25.- 30.	0,51 (± 0,06)
		78FR-G-219		0,41 (± 0,03)
		78FR-G-284		0,32 (± 0,05)
		78FR-G-344		0,33 (± 0,07)
4.	78FR-G-344	78FR-G-344	79.- 83.	0,81 (± 0,05)
		78FR-G-219		0,67 (± 0,06)
		78FR-G-284		0,42 (± 0,05)
		78FR-G-299		0,50 (± 0,07)

Tabelle V

Cytotoxische Aktivität im Serum tumortragender Ratten 14, 21, 28 und 35 Tage nach der Inokulation von $10x10^6$ Zellen der Kultur 78FR-G-219

Tag	Tumorgewicht in g		Cytotoxischer Index	
	Progressor-tiere	Regressor-tiere	Progressor-tiere	Regressor-tiere
14	1,0	1,0	0,39 ± 0,04	0,39 ± 0,04
21	3,5	-	0,34 ± 0,08	0,44 ± 0,09
28	8,0	-	0,32 ± 0,06	0,42 ± 0,07
35	14,5	-	0,26 ± 0,06	0,35 ± 0,04

5.3. Immun-Adhärenz-Test (IAT)

Die im IAT eingesetzten Zellen der Kultur 78FR-G-219 und 78FR-G-219C_3 eigneten sich gut als "targets". Die ausgesäten Zellen breiteten sich gleichmäßig verteilt in den Platten aus, ohne zu akkumulieren und gewährleisteten dadurch die Möglichkeit der Erythrocytenanlagerung von allen Seiten. Im allgemeinen ergab sich bei entsprechendem Antiserum ein klar positives Ergebnis, d.h. es lagerten sich mindestens drei und je nach Intensität bis zu 50 Erythrocyten an einer reaktiven Zelle an. Sowohl der Zelleib als auch die Zellausläufer waren mit Erythrocyten beladen (Abb. 5 c-d).

Abb. 5: Nachweis gliomassoziierter Antigene bei der Zellinie 78FR-G-344 mit Hilfe der Immunofluoreszenz: Spezifische Fluoreszenz hauptsächlich an der Zellmembran (a,b). Nachweis gliomassoziierter Antigene bei der Kultur 78FR-G-219 mit Hilfe der Immun-Adhärenz (c,d): Mit Ausnahme weniger Zellen (d,⟶) reagieren die meisten Zellen positiv. Nahezu keine Erythrocyten-Adhärenz an der Tumorzellmembran bei der mit Normalserum durchgeführten negativen Kontrolle (c). (a-b, Immunofluoreszenz, a x 200, b x 300; c-d, Phasenkontrast, c,d x 160).

5.3.1. Seren immunisierter Tiere

Alle 20 getesteten Seren, der mit der Kultur 78FR-G-219 und 78FR-G-219C_3 immunisierten Ratten, waren im IAT positiv. Im Verdünnungsbereich 1:4 bis 1:16 wurde die deutlichste Reaktion - bis zu 55% reaktive Zellen - festgestellt.

Die Seren einer Immunisierungsgruppe von 10 Tieren wurden 14 Tage nach Erstkontakt mit dem Antigen ($1x10^6$ TNBS-modifizierte Zellen der Kultur 78FR-G-219) bzw. 14 Tage nach der Boosterung (Tab. I, Gruppe V, 78FR-G-219) gewonnen und in der Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:64 gegen Zellen der Kultur 78FR-G-219 als "targets" getestet. Bis zu einer Antikörperverdünnung von 1:32 bzw. 1:64 konnten mit allen Seren eine ausgeprägte Immun-Adhärenz beobachtet werden. Die meisten "Rosettenbildungen" wurden bei der Serumverdünnung von 1:8 beobachtet (Abb. 6). Durchschnittlich waren 51,5% bzw. 55,0% der Zellen mit Erythrocyten beladen. In den höheren Verdünnungen reagierten die Seren der immunisierten Tiere stärker als die Seren der Ratten mit nur einmaligem Antigenkontakt.

5.3.2. Kreuzreaktionen

Zum Nachweis möglicher gemeinsamer Oberflächenantigene wurden Immunseren der Kulturen 78FR-G-284, 78FR-G-299 und 78FR-G-344 gegen Zellen der Kultur 78FR-G-219 als "targets" im IAT eingesetzt. Immun-Adhärenz-Reaktionen konnten mit allen Seren der verschiedenen Immunisierungsgruppen ausgelöst werden (Abb. 7).

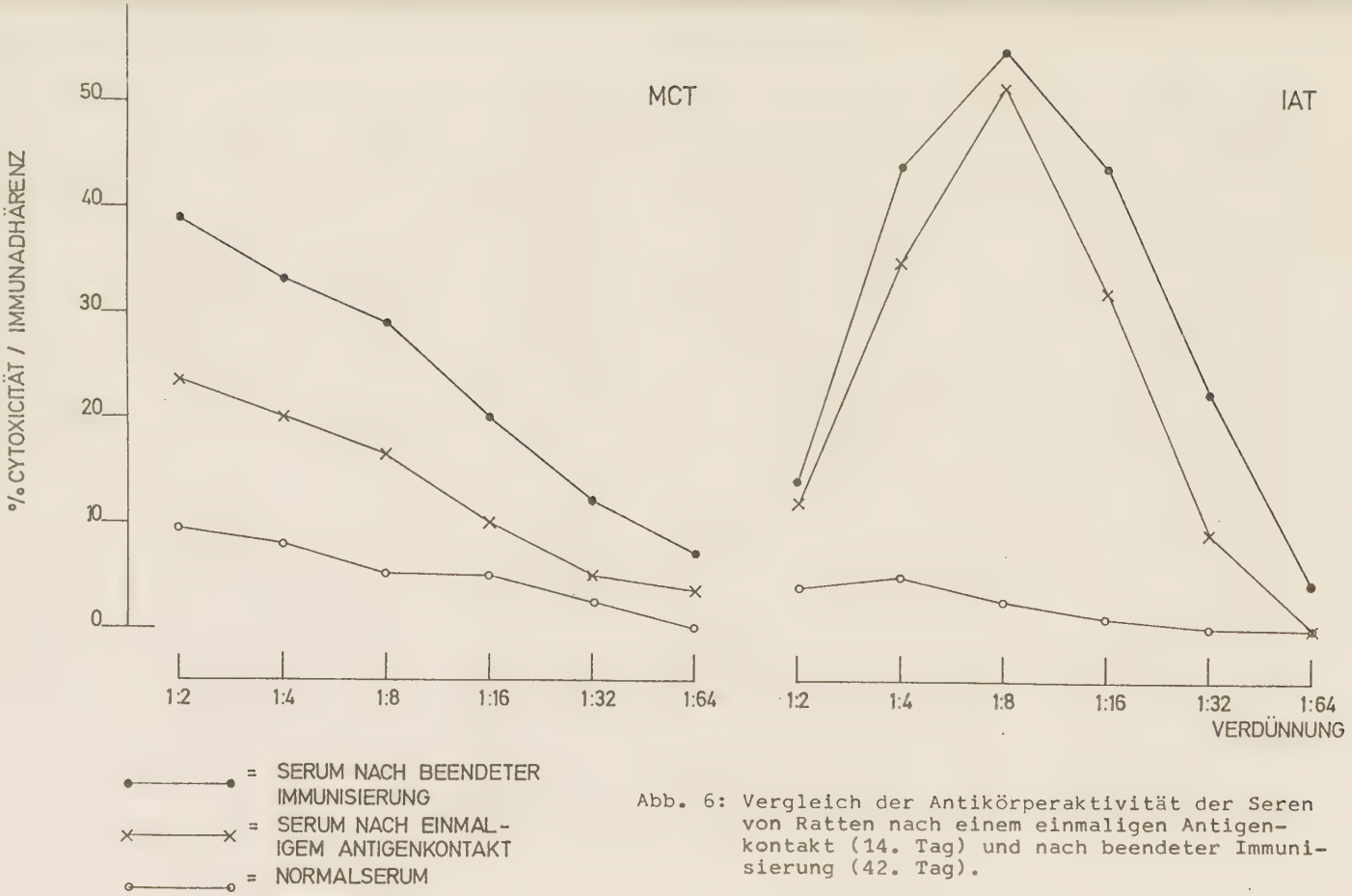

Abb. 6: Vergleich der Antikörperaktivität der Seren von Ratten nach einem einmaligen Antigenkontakt (14. Tag) und nach beendeter Immunisierung (42. Tag).

Die Anti-78FR-G-284-Seren reagierten ähnlich wie die Anti-78FR-G-299-Seren im Verdünnungsbereich 1:4 bis 1:16 deutlich positiv (35% bzw. 40% IA). Dagegen riefen die Anti-78FR-G-344-Seren im Bereich 1:4 bis 1:64 ausgeprägtere Reaktionen (50% IA) hervor. In den Verdünnungen 1:2 und 1:4 fielen bei diesen Serumproben sehr viele tote "target"-Zellen auf.

5.3.3. Seren tumortragender Tiere

15 Serumproben sowohl von Tieren mit progredientem Tumorverlauf als auch von Regressortieren wurden im IAT getestet. Alle Seren waren zwischen 7 und 28 Tagen nach der Transplantation gewonnen worden. Sie wurden jeweils in der Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:64 eingesetzt. Eine positive Reaktion konnte nur in zwei Fällen festgestellt werden. Beide Seren waren 14 Tage nach der Tumorzellinokulation entnommen worden.

Das eine Serum (von einem Progressortier) zeigte eine deutliche Immun-Adhärenz-Reaktion im Bereich von 1:4 bis 1:16. Für das andere Serum (von einem Regressortier) ergab sich ein schwach positives Ergebnis in der Verdünnung 1:8 bis 1:32.

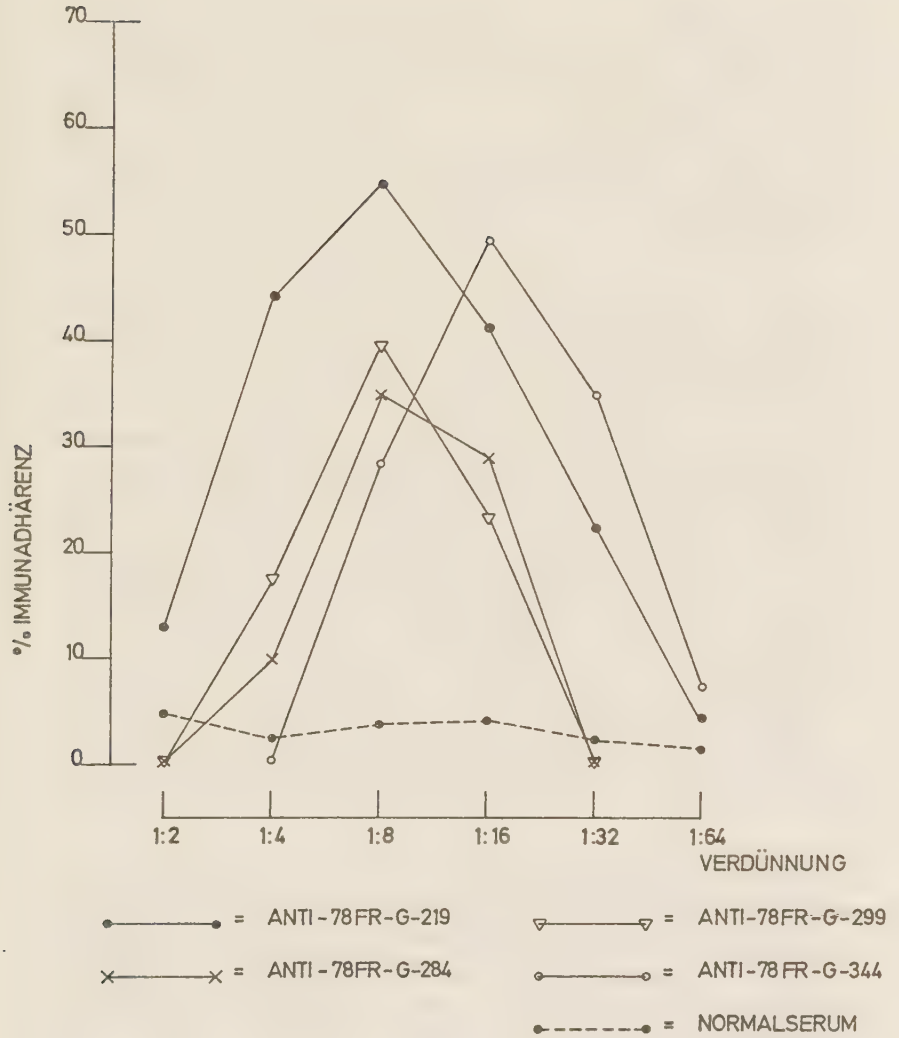

Abb. 7: Immun-Adhärenz-Aktivität der Antiseren der mit 78FR-G-219, 78FR-G-284, 78FR-G-299 und 78FR-G-344 immunisierten Ratten gegen 78FR-G-219 Zellen als "targets".

E. DISKUSSION

Eine systematische Untersuchung der Frage des Vorkommens von Oberflächenantigenen bei Gliomzellinien setzt voraus, daß

a) mehrere gut charakterisierbare Zellinien zur Verfügung stehen,
b) ausreichend hochtitrige Antiseren gewonnen werden können,
c) eine Analyse der Antikörperspezifitäten erfolgt und
d) mehr als ein Meßverfahren zur Antikörperbestimmung benutzt wird (WIKSTRAND et al., 1977).

ad a) Die vorliegenden morphologischen und immunocytochemischen Befunde sprechen für einen neuroektodermalen Ursprung des untersuchten Zellmaterials. Insbesondere durch den Nachweis gliaspezifischer Proteine ist die gliale Natur der Tumorzellinien gesichert. In Anbetracht der gleichmäßig positiven Reaktion der Zellen der Kultur 78FR-G-219C_3 beim GFA-Nachweis ist der astrocytäre Charakter der Zellen dieser Linie sehr wahrscheinlich. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von BENDA et al. (1971) konnte die Beibehaltung des neuroektodermalen Charakters der Zellinien, selbst nach zweijähriger Kultivation in vitro, nachgewiesen werden.

Mit zunehmender Kultivationszeit kam es durch den allmählichen Verlust der typischen, langen Zellfortsätze zu morphologischen Veränderungen der Gliomzellen. Diese Beobachtung bestätigt auch die Befunde anderer Autoren (LUMSDEN, 1963; MANUELIDIS, 1969; CRAVIOTO et al., 1972; FORNATO und SCHIFFER, 1972; THUST, 1976).

Die Tumorogenität der etablierten Kulturen blieb bis zur 30. bzw. 50. Subkultur in vitro annähernd erhalten. Danach begann sich die Zahl erfolgreicher Transplantationen zu verringern, so daß die Tumorzellen in höherer Zellzahl inokuliert werden mußten, um das Angehen eines subkutanen Transplantationstumors in vivo zu gewährleisten. CRAVIOTO (1978) berichtet ebenfalls über veränderte Transplantationsergebnisse bei Rattengliomkulturen aus höheren Passageraten. Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Tumorogenität und der gleichzeitigen Zunahme der Antigenität einer etablierten Langzeitgliomkultur. Die genauen Ursachen für dieses Verhalten sind bislang nicht geklärt. Jedoch könnte die Zunahme der Antigenität in vitro kultivierter Tumorzellen durch die Entstehung neuer Antigene an der Zelloberfläche erklärt werden. Dies könnte durch verschiedene Mechanismen bedingt sein: 1) durch die Adsorption oder Inkorporation von Stoffen mit Antigencharakter aus dem umgebenden Medium (z.B. Serumproteine); 2) durch strukturelle Veränderungen der Zellmembran im Laufe der Kultivationszeit und 3) durch eine eventuelle Expression von Neoantigenen, die nicht tumorassoziiert sind (WARNATZ, 1975). Die ursprüngliche Tumorogenität der Gliomzellinien konnte jedoch durch in vitro/in vivo-Wechselpassagen immer wiedererlangt werden.

ad b) Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte - in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren - nachgewiesen werden, daß die Zellen der chemisch induzierten Gliome antigenen Charakter besitzen und, zumindest in vitro meßbare, humorale Immunreaktionen auslösen können (LIM und KLUSKENS, 1972; DAY und BIGNER, 1973; FIELDS et al., 1975; STAVROU et al., 1978a).

In unterschiedlichem Ausmaß waren sowohl in den Seren von Tumorträgern als auch in den Seren von Regressor- und immunisierten Tieren humorale Antikörper enthalten.

Die zwischen Tumorgröße und entsprechenden Antikörpertiter bestehende Korrelation - Abnahme der cytotoxischen Aktivität bei zunehmendem Tumorwachstum - könnte möglicherweise auf einer immunsuppressiven Wirkung des wachsenden Tumors auf den Tumorträger beruhen, ähnlich wie sie von BROOKS et al. (1972) und MAHALEY et al. (1977) bei Gliompatienten beobachtet wurde. Wie es sich schon zeigen ließ (SJÖGREN, 1965; BALDWIN, 1973), wurde auch in vorliegender Untersuchung nach operativer Entfernung des Tumors jedoch ein erneutes Transplantat derselben Gliomzellinie abgestoßen, wobei gleichzeitig erhöhte cytotoxische Antikörperwerte gemessen wurden.

Der cytotoxische Titer im Serum nach Immunisierung mit nativen Gliomzellen (Tab. I, Immunisierungsgruppe V) war relativ niedrig (Tab. III). Diese Beobachtung bestätigt die Ansicht, daß gliomassoziierte Antigene nur schwache Immunogene sind (CORNAIN et al., 1975; CRAVIOTO et al., 1976; STAVROU et al., 1978a; SPENCE et al., 1979).

Die Modifikation der Gliomzellen mit DMS und TNBS führte zu einer eindeutigen, wenn auch unterschiedlichen Steigerung der Antigenität der behandelten Zellen (Tab. III). Die höchste Cytotoxicität der Seren wurde bei den Tieren erreicht, die mit TNBS-modifizierten Gliomzellen immunisiert und mit nativen Gliomzellen geboostert wurden (Tab. II). Durch Boostern mit $10x10^6$ nativen Gliomzellen konnte die cytotoxische Aktivität bis zu 45% gegenüber dem Boostern mit $1x10^6$ nativen Gliomzellen erhöht werden.

Die ermittelten Ergebnisse über TNBS-modifizierte Gliomzellen stehen mit den von GALILI et al. (1976) erhobenen Befunden über trinitrophenylierten YAK-Zellen in weitgehender Übereinstimmung. Allerdings lassen sich geringe Abweichungen in der Verlaufskurve des cytotoxischen Antikörpertiters von Gliomzellen und YAK-Zellen feststellen, obwohl ähnliche Immunisierungs- und Nachweismethoden angewandt wurden. Ferner liegen aus anderen Untersuchungen entsprechende Ergebnisse bezüglich einer Erhöhung der Antigenität von Tumorzellen nach Behandlung mit DNP bzw. TNP vor (MARTIN et al., 1971; CAVALLO und FORNI, 1974; BURAKOFF et al., 1976; LEMONNIER et al., 1977).

Es ist erwähnenswert, daß die Immunisierung mit DMS-modifizierten Zellen in mehreren Fällen zur Tumorbildung an den Inokulationsstellen führte. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war sogar eine Verstärkung des Tumorwachstums zu beobachten, was auf ein "enhancement"-Phänomen zurückgeführt werden könnte. Besonders auffällig war dies in der mit DMS und CFA immunisierten Gruppe (Tab. II). Darüberhinaus wurde auch ersichtlich, daß die Verwendung von CFA nur unbedeutenden Einfluß auf die Antigenität der chemisch modifizierten Gliomzellen hatte. Immunisierungsversuche von SPENCE et al. (1979) mit Gliomzellen und CFA verliefen ebenfalls nicht zufriedenstellend.

Obwohl die Reaktionsweisen von DMS und TNBS mit Proteinen weitgehend bekannt sind (STAAB und ANDERER, 1976; PRAGER und BAECHTEL, 1973), bleibt bislang ungeklärt, auf welche Art die Antigenität der modifizierten Zellen beeinflußt wird. Es ist anzunehmen, daß die Reaktion zu der Bildung von Hapten-Carrier-Komplexen an der Zelloberfläche führt, verbunden mit einer Verstärkung der Antigenität der Carrier-Proteine. Da durch den Modifikations-

prozess auch zelleigene Antigene verändert werden können (SHEARER, 1974), läßt sich erst nach Absorption der Antiseren mit nativen sowie chemisch modifizierten syngenen normalen Hirnzellen eine aussagekräftige Angabe machen.

ad c) Zur Absicherung der Spezifität der induzierten Antikörper wurden verschiedene Absorptionen durchgeführt. Die Absorption der Antiseren mit Hirnzellen von fetalen, neugeborenen und erwachsenen syngenen Ratten bedingte den relativ geringen Cytotoxicitätsverlust von 5-10% (Abb. 4). Offensichtlich handelt es sich bei den vorliegenden tumorassoziierten Antigenen nicht um eine Reexpression onkofetaler Antigene. Allerdings kann diese Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen werden, da die entnommenen fetalen Gehirne (15. Tag p.c.) einer bestimmten Stufe der pränatalen Entwicklung entsprechen.

Ein besonderes Problem stellt sich bei in vitro in FKS-haltigem Medium gezüchteten Zellen. Es wurde bereits mehrfach darauf hingewiesen, daß sich xenogene Proteine an die Oberflächenmembran der Tumorzellen binden und dadurch als tumorassoziierte Antigene exprimieren können (HAMBURGER et al., 1963; IRIE et al., 1974; FORNI und GREEN, 1976; LIAO et al., 1979). In menschlichen und anderen Seren sind bisweilen natürliche Antikörper vorhanden, die mit den FKS-Antigenen der Tumorzellen reagieren (IRIE et al., 1974). Nach Immunisierungen mit kultivierten Tumorzellen können sogar spezifische gegen FKS gerichtete Antikörper gebildet werden (FORNI und GREEN, 1976; LIAO et al., 1979). In vorliegender Untersuchung läßt jedoch der unbedeutende Titerrückgang (5%) nach Absorption der Antiseren mit FKS auf einen geringen Anteil gegen FKS gerichteter Antikörper schließen (Abb. 4).

Zur weiteren Spezifizierung der Antikörper wurden in-vitro-Kreuzreaktionen durchgeführt. Gemeinhin gilt die Ansicht, daß chemisch induzierte Tumoren zwar spezifische, jedoch für jeden einzelnen Tumor individuelle Antigene exprimieren (HERBERMAN, 1977). Mit einem Tumor immunisierte Tiere waren nicht gegen "challenge" mit anderen, durch das gleiche chemische Cancerogen entstandene Tumoren geschützt (PREHN und MAIN, 1957; KLEIN et al., 1960). Demgegenüber gibt es jedoch auch Immunisierungsversuche, bei denen sich eine belastbare Immunität gegenüber anderen, histologisch ähnlichen Tumoren entwickelte (REINER und SOUTHAM, 1967; HOLMES et al., 1971; FORBES et al., 1975).

In vitro wurden antigene Kreuzreaktionen der vier Rattengliome in unterschiedlicher Ausprägung sowohl mit dem Immunofluoreszenz-Test und dem Mikrocytotoxicitäts-Test als auch mit dem Immun-Adhärenz-Test nachgewiesen.

Den Ergebnissen der Tests zufolge, traten offensichtlich mehrere Antigene auf, die nur zum Teil Kreuzreaktionen hervorrufen konnten. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden über gemeinsame kreuzreagierende tumorassoziierte Antigene bei Gliomen des Menschen, die im allogenen und xenogenen System dargestellt werden konnten (COAKHAM, 1974; KORNBLITH et al., 1974; WAHLSTRÖM et al., 1974; SHEIKH et al., 1977; WIKSTRAND et al., 1977; PFREUNDSCHUH et al., 1978; COAKHAM et al., 1980). Die Zellinie 78FR-G-344 scheint ausgeprägtere kreuzreagierende antigene Merkmale zu besitzen als die anderen Gliomzelllinien, da das entsprechende Immunserum im Mikrocytotoxicitäts-Test mit sämtlichen "targets" am stärksten reagierte (Tab. IV). In der Immun-Adhärenz-Reaktion war es gegenüber der Kultur 78FR-G-219 fast ebenso stark wie das Anti-78FR-G-219-Serum (Abb. 7).

ad d) Gegen Gliomzellen gerichtete cytotoxische Antikörper sind verschiedentlich mit dem komplementabhängigen Mikrocytotoxicitäts-Test nachgewiesen worden (KORNBLITH et al., 1974; LEVY et al., 1972; WOOSLEY et al., 1977; STAVROU et al., 1978a). In der vorliegenden Untersuchung hat sich der Test als eine zuverlässige Methode erwiesen, mit deren Hilfe reproduzierbare und quantifizierbare Ergebnisse erzielt werden können. Darüberhinaus bestätigen die beim indirekten Immunofluoreszenz-Test ermittelten Befunde die Ergebnisse anderer Autoren über fluoreszierende Gliomantikörper (WAHLSTRÖM et al., 1974; WIKSTRAND et al., 1977; STAVROU et al., 1978a).

Der Immun-Adhärenz-Test hat sich auf Grund seiner besonderen Empfindlichkeit (O'NEILL, 1968) als eine brauchbare Methode zum Nachweis immunologischer Reaktionen an der Zelloberfläche bewährt (NISHIOKA et al., 1969; TACHIBANA und KLEIN, 1970; COAKHAM et al., 1980). Allerdings handelt es sich um einen in-vitro-Test, dessen Anwendung sich mehr für qualitative Aussagen empfiehlt. In Analogie zu den Ergebnissen des Mikrocytotoxicitäts-Tests und des Immunofluoreszenz-Tests, hinsichtlich der Antigenität der untersuchten Rattengliome, konnten im Immun-Adhärenz-Test ebenfalls Antigen-Antikörper-Komplexe durch Erythrocytenanlagerungen sichtbar gemacht werden. Mit den Seren von Gliom-Patienten sind ebenfalls in einigen Fällen eindeutige IA-Reaktionen festgestellt worden (PFREUNDSCHUH et al., 1978; COAKHAM et al., 1980).

Da offensichtlich keine bemerkenswerte Korrelation zwischen der Immunreaktion im Mikrocytotoxicitäts-Test und im Immun-Adhärenz-Test besteht (Abb. 6), sind möglicherweise unterschiedliche Antikörper an den Reaktionen beteiligt. Nach den Angaben von SELL und SPOONER (1966)

sollen für die Immun-Adhärenz-Reaktion hauptsächlich IgM-Antikörper, für den Mikrocytotoxicitäts-Test dagegen sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper verantwortlich sein. Dies wird auch von anderen Autoren (NISHIOKA et al., 1967; TACHIBANA und KLEIN, 1970; COAKHAM et al., 1980) bestätigt. Die Tatsache, daß die IgM-Antwort auf ein Antigen sehr früh eintritt, während die IgG-Antikörper erst im weiteren Verlauf ihr Maximum erreichen, spricht für die Dominanz von IgM-Antikörpern in den durchgeführten Immun-Adhärenz-Reaktionen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Durch systemische perorale Verabreichung von Methylnitrosoharnstoff wurde bei sechs Monate alten Fischer Inzuchtratten (F 344) Hirntumoren induziert. Aus vier der in vitro explantierten und erfolgreich gezüchteten Tumoren konnten folgende permanente Gliomzellinien etabliert werden: 78FR-G-219 (pleomorphes Gliom), 78FR-G-284 (Mischgliom II), 78FR-G-299 (Astrocytom II) und 78FR-G-344 (Mischgliom II). Die Zellinien produzierten das gliaspezifische S-100-Protein und waren sowohl bei intracerebraler als auch bei subkutaner Inokulation an syngenen Tieren tumorogen.

Die Antigenität der gezüchteten Gliomzellen wurde in verschiedenen Passagen sowohl im nativen Zustand als auch nach chemischer Modifikation vergleichend untersucht. Verschiedene Immunisierungsmethoden wurden mit DMS- bzw. TNBS-modifizierten Gliomzellen bei syngenen Tieren durchgeführt. Das Vorkommen humoraler Gliomantikörper wurde mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz, des komplementabhängigen Mikrocytotoxicitäts-Tests und des Immun-Adhärenz-Tests untersucht.

Die chemische Modifikation der Tumorzellen sowohl mit DMS als auch mit TNBS führte zu einer Erhöhung deren Antigenität. Die deutlichste Steigerung der Produktion gliomcytotoxischer Antikörper war nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Zellen zu beobachten. Der Grad der Cytotoxicität variierte bei den verschiedenen Zellinien. Die nach der Immunisierung mit den TNBS-modifizierten Gliomzellinien 78FR-G-219, 78FR-G-284, 78FR-G-299 und 78FR-G-344 gewonnenen Antiseren zeigten eine deutliche Kreuzreaktivität.

Nach Absorption der Antiseren mit mehreren syngenen Geweben sowie mit FKS erfolgte keine wesentliche Änderung der Gliomcytotoxicität. Die Seren von Tieren, die mit nativen syngenen Hirnzellen immunisiert wurden, zeigten keine nennenswerte Gliomcytotoxicität. Durch die Immunisierung mit TNBS-modifizierten syngenen Hirnzellen wurden jedoch Antiseren produziert, die sowohl gegen normale Hirnzellen als auch gegen Gliomzellen geringgradige cytotoxische Aktivitäten aufwiesen.

SUMMARY

Brain tumors were induced in six-month-old inbred Fischer rats (F 344) by peroral administration of methylnitrosourea. Four of these tumors were established in culture and propagated as 78FR-G-219 (pleomorphic glioma), 78FR-G-284 (mixed glioma II), 78FR-G-299 (astrocytoma II) and 78FR-G-344 (mixed glioma II) permanent lines. All cell lines produced the S-100 protein and grew as tumors when inoculated ic or sc in syngeneic hosts.

A comparative study of the antigenicity of these lines at different passage levels was carried out using native and chemically modified cells. Various methods of immunization using glioma cells treated with dimethylsulfate resp. trinitrobenzene sulfonic acid were tested in syngeneic animals. The incidence of humoral glioma antibodies was investigated by the indirect immunofluorescence method, by the complement-dependent microcytotoxicity test and by the immune adherence assay.

Chemical modification of the tumor cells enhanced antigenicity of the treated cells. The increase of cytotoxic antibodies was most obvious after immunization with TNBS-modified glioma cells. Cytotoxicity values varied in the different cell lines. Antisera raised after immunization with the TNBS-modified cells of 78FR-G-219, 78FR-G-284, 78FR-G-299 and 78FR-G-344 cross-reacted with the cells of all these lines.

The cytotoxicity values of antisera did not change significantly after absorption with some syngeneic tissues and with fetale bovine serum. Antisera raised against native syngeneic brain cells showed virtually no cytotoxicity for glioma cells. Antisera raised against

syngeneic brain cells treated with TNBS, however, had slight cytotoxic activities against normal brain cells and glioma cells as well.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sta 134/2), den C. Bohnewand-Fonds für Krebsforschung, Universität München und die Münchner Universitätsgesellschaft e.V. durchgeführt.

G. LITERATURVERZEICHNIS

ALBRIGHT, L., MADIGAN, J.C., GASTON, M.R., HOUCHENS, D.P.:
Therapy in an intracerebral murine glioma model, using Bacillus Calmette-Guérin, neuraminidase-treated tumor cells and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea.
Cancer Res. 35, 658-664 (1975)

AMOS, D.B., BASHIR, H., BOYLE, W., MacQUEEN, M., TILLIKAINEN, A.:
A simple micro cytotoxicity test.
Transplantation 7, 220-223 (1969)

ASHWOOD-SMITH, M.J.:
Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulphoxide.
Nature (Lond.) 190, 1204 (1961)

AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T.:
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents.
Immunochemistry 6, 53-66 (1969)

BAKER, M.A., TAUB, R.N.:
Immunotherapy of human cancer.
In: P. Kallós, B.H. Weksman and A. De Weck (ed.)
Progress in allergy, 227-299
S. Karger, Basel (1973)

BALDWIN, R.W.:
Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours.
Brit. J. Cancer 9, 652 (1955)

BALDWIN, R.W.:
Immunological aspects of chemical carcinogenesis.
Advanc. Cancer Res. 18, 1-75 (1973)

BALDWIN, R.W., PIMM, M.V.:
BCG immunotherapy of rat tumors of defined immunogenicity.
Natl. Cancer Inst. Monograph 39, 11-19 (1973 a)

BALDWIN, R.W., PIMM, M.V.:
BCG immunotherapy of local subcutaneous growth and post-surgical pulmonary metastases of a transplanted rat epithelioma of spontaneous origin.
Int. J. Cancer 12, 420-427 (1973 b)

BANSAL, S.C., SJÖGREN, H.O.:
Effect of BCG on various facets of the immune response against polyoma tumors in rats.
Int. J. Cancer 11, 162-171 (1973)

BEKESI, J.G., ARNEAULT, G.S., WALTER, L., HOLLAND, J.F.:
Immunogenicity of leukemia L 1210 cells after neuraminidase treatment.
J. Natl. Cancer Inst. 49, 107-118 (1972)

BENDA, P., SOMEDA, K., MESSER, J., SWEET, W.H.:
Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture.
J. Neurosurg. 34, 310-323 (1971)

BROOKS, W.H., NETSKY, M.G., NORMANSELL, D.E.:
Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors: characterization of a humoral immunosuppressive factor.
J. Exp. Med. 136, 1631-1647 (1972)

BUBENIK, J., PERLMANN, P., HELMSTEIN, K., MOBERGER, G.:
Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinoma.
Int. J. Cancer 5, 310-319 (1970)

BURAKOFF, S.J., GERMAIN, R.N., BENACERRAF, B.:
Crossreactive lysis of trinitrophenyl (Tnp)-derivatized H-2 incompatible target cells by cytolytic T lymphocytes generated against syngeneic Tnp spleen cells.
J. Exp. Med. 144, 1609-1620 (1976)

CAVALLO, G., FORNI, G.:
Cell reactivity towards syngeneic neoplastic cells in mice hypersensitized to dinitrophenol.
Europ. J. Cancer 10, 103-106 (1974)

COAKHAM, H.B.:
Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature (Lond.) 250, 328-330 (1974)

COAKHAM, H.B., KORNBLITH, P.L., QUINDLEN, E.A., POLLOK, L.A., WOOD, W.C., HARNETT, L.C.:
Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: in vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.
J. Natl. Cancer Inst. 64, 223-233 (1980)

COONS, A.H.:
The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658-662 (1957)

CORNAIN, S., CARNAUD, C., SILVERMAN, D., KLEIN, E., RAJEWSKY, M.F.:
Spleen-cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specifity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes.
Int. J. Cancer 16, 301-311 (1975)

CRAVIOTO, H., PALEKAR, L., WEISS, E., BENNETT, K.:
Experimental neurinoma in tissue culture.
Acta Neuropath. (Berl.) 21, 154-164 (1972)

CRAVIOTO, H., HIRT, P., BLOOM, A., DRNOVSKY, F.:
Immunology of experimental brain tumors in inbred rats.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 35, 103 (1976)

CRAVIOTO, H.:
Immunology of experimental brain tumors.
In: H. Waters (ed.) The handbook of cancer immunology,
Vol. 3, 329-363
New York and London: Garland STPM Press (1978)

CURRIE, G.A., BAGSHAWE, K.D.:
The effect of neuraminidase on the immunogenicity of
the Landschütz ascites tumour: site and mode of action.
Brit. J. Cancer 22, 588-594 (1968)

DAY, E.D., BIGNER, D.D.:
Specifity, cross-reactivity, and affinity of ^{125}I-labelled
antiglioma antibodies for monolayers of cultured glioma cells.
Cancer Res. 33, 2362-2372 (1973)

DELPECH, B., DELPECH, A., CLEMENT, J., LAUMONIER, R.:
Étude immunochimique et immunologique des tumeurs du
cerveau humain.
Int. J. Cancer 9, 374-382 (1972)

DORÉ, J.F., HADJIYANNAKIS, M.J., GUIBOUT, C., COUDERT, A.,
MARHOLEV, L., IMAI, K.:
Use of enzyme-treated cells in immunotherapy of a murine
leukaemia.
Behring Inst. Mitt. 55, 326-328 (1974)

DOUGHERTY, R.M.:
Use of dimethyl sulfoxide for preservation of tissue culture cells by freezing.
Nature (Lond.) 193, 550 (1962)

DRUCKREY, H., IVANKOVIĆ, S., PREUSSMANN, R.:
Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff.
Z. Krebsforsch. 66, 389-408 (1965)

ELLING, H., STAVROU, D.:
Über die Antigenität eines chemisch induzierten neurogenen Sarkoms der Ratte.
Vet. Pathol. 17, 477-489 (1980)

FIELDS, K.L., GOSLING, C., MEGSON, M., STERN, P.L.:
New cell surface antigens in rat defined by tumors of the nervous system.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1296-1300 (1975)

FORBES, J.T., NAKAO, Y., SMITH, R.T.:
Tumor-specific immunity to chemically induced tumors.
J. Exp. Med. 141, 1181-1200 (1975)

FORNATO, L., SCHIFFER, D.:
In vitro culture observations on neurinoma induced experimentally in the rat by ethylnitrosourea.
Acta Neuropath. 20, 199-206 (1972)

FORNI, G., GREEN, J.:
Heterologous sera: a target for in vitro cell-mediated cytotoxicity.
J. Immunol. 116, 1561-1565 (1976)

FROESE, G., BERCZI, J., SEHON, A.M.:
Neuraminidase-induced enhancement of tumor growth in mice.
J. Natl. Cancer Inst. 52, 1905-1908 (1974)

GALILI, N., NAOR, D., Å SJÖ, B., KLEIN, G.:
Induction of immune responsiveness in a genetically low-responsive tumor-host combination by chemical modification of the immunogen.
Eur. J. Immunol. 6, 473-476 (1976)

GAMBETTI, P., ERULKAR, S.E., SOMLYO, A.P., GONATAS, N.K.:
Calcium-containing structures in vertebrate glial cells. Ultrastructural and microprobe analysis.
J. Cell Biol. 64, 322-330 (1975)

GÖTZE, D., FERRONE, S., REISFELD, R.:
Serologic crossreactivity between H-2 and Hl-A antigens. I. Specific reactivity of rabbit anti-Hl-A sera against murine cells.
J. Immunol. 109, 439-450 (1972)

HAGLID, K.G., STAVROU, D.:
Water-soluble and pentanol-extractable proteins in human brain normal tissue and human brain tumors, with special reference to S-100 protein.
J. Neurochem. 20, 1523-1532 (1973)

HAMBURGER, R.N., PIOUS, D.A., MILLS, S.E.:
Antigenic specificities acquired from the growth medium by cells in tissue culture.
Immunology 6, 439-449 (1963)

HASS, W.K.:
Soluble tissue antigens in human brain tumor and cerebrospinal fluid.
Arch. Neurol. 14, 443-447 (1966)

HAUSCHKA, T.S., WEISS, L., HOLDRIDGE, B.A., CUDNEY, T.L., ZUMPFT, M., PLANINSEK, J.A.:
Karyotypic and surface feature of murine TA 3 carcinoma cells during immunostimulation in rats and mice.
J. Natl. Cancer Inst. 47, 343-357 (1971)

HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I.:
Cellular immunity against tumor antigens.
Advan. Cancer Res. 12, 167-223 (1969)

HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E., SJÖGREN, H.O., WARNER, G.A.:
Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types.
Int. J. Cancer 7, 1-16 (1971)

HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E.:
Cellular immunity and blocking antibodies to tumors.
J. Reticuloendoth. Soc. 10, 131-136 (1971)

HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I., BROWN, J.P.:
Unique and common tumor-specific transplantation antigens of chemically-induced mouse sarcomas.
Int. J. Cancer 21, 317-322 (1978)

HERBERMAN, R.B.:
Immunogenicity of tumor antigens.
Biochim. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)

HIRT, P., CRAVIOTO, H.:
Isolation of a fetal rat (CDF) central nervous system associated antigen.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 33, 186 (1974)

HOLMES, E.C., MORTON, D.L., SCHIDLOVSKY, G., TRAHAN, E.:
Cross-reacting tumor-specific transplantation antigens in methylcholanthrene-induced guinea pig sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 46, 693-700 (1971)

IRIE, R.F., IRIE, K., MORTON, D.L.:
Natural antibody in human serum to a neoantigen in human cultured cells grown in fetale bovine serum.
J. Natl. Cancer Inst. 52, 1051-1058 (1974)

ITO, M., TAGAYA, I.:
Immune adherence hemagglutination test as a new sensitive method for titration of animal virus antigens and antibodies.
Jap. J. Med. Sci. Biol. 19, 109 (1966)

IVANKOVIĆ, S.:
Selektive Erzeugung von Geschwülsten im Gehirn und Nervensystem.
Ed: H.E. Bode: Krebsforschung und Krebsbekämpfung
Bd VI, 97
München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1967

JÄNISCH, W., SCHREIBER, D.:
Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems.
Jena: Fischer (1969)

KLEIN, G., SJÖGREN, H.O., KLEIN, E., HELLSTRÖM, K.E.:
Demonstration of resistance against methylcholantrene induced sarcomas in the primary autochthonous host.
Cancer Res. 20, 1561-1572 (1960)

KLEIN, G.:
Tumor antigens.
Amer. Rev. Microbiol. 20, 223-252 (1966)

KLEIN, E.:
Hypersensitivity reactions at tumor sites.
Cancer Res. 29, 2351-2362 (1969)

KLEIN, G.:
Tumor immunology in F.H. Bach and R.H. Good (eds.),
Clinical immunobiology, Vol. 1, 219-239
New York: Academic Press 1972

KOLDOWSKY, P., WEINSTEIN, J.:
Expression of non-tumor specific antigen in human tumor cells.
J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 37, 33-35 (1973)

KORNBLITH, P.L., DOHAN, F.C. Jr., WOOD, W.C., WHITMAN, B.O.:
Human astrocytoma: serum-mediated immunologic response.
Cancer 33, 1512-1519 (1974)

LEMONNIER, F., BURAKOFF, S.J., GERMAIN, R.N., BENACERRAF, B.:
Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 74, 1229-1233 (1977)

LEVY, N.L., MAHALEY, M.S. Jr., DAY, E.D.:
In vitro demonstration of cell-mediated immunity to human brain tumors.
Cancer Res. 32, 477-482 (1972)

LIAO, S.K., RAHMAN, A.F.R., KWONG, P.C., DENT, P.B.:
A simple microassay for detection of antibodies to fetal calf serum and related antigens and its application to the serological definition of human tumor antigens.
J. Immunol. Meth. 27, 111-125 (1979)

LIM, R., KLUSKENS, L.:
Immunological specifity of astrocytoma antigens.
Cancer Res. 32, 1667-1670 (1972)

LINDEMANN, J., KLEIN, P.A.:
Immunological aspects of viral oncolysis.
Berlin: Springer-Verlag 1967

LUMSDEN, C.E.:
The study of tissue culture of tumors of the nervous system.
In: D.S. Russel and L.J. Rubinstein (eds.):
Pathology of tumors of the nervous system, 334-430
London: Arnold Ltd. 1963

MAHALEY, M.S. Jr., BROOKS, W.H., ROSZMAN, T.L., BIGNER, D.D., DUDKA, L., RICHARDSON, S.:
Immunobiology of primary intracranial tumors.
Part I: Studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients.
J. Neurosurg. 46, 467-476 (1977)

MANUELIDIS, E.E.:
Experiments with tissue cultures and heterologous transplantation of tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 409-431 (1969)

MARCUS, P.J., CIECIURA, S.J., PUCK, T.T.:
Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues.
J. Exp. Med. 104, 615 (1956)

MARTIN, W.J., WUNDERLICH, J.R., FLETCHER, F., INMAN, J.K.:
Enhanced immunogenicity of chemically-coated syngeneic tumor cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 68, 469-472 (1971)

MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B., WITTMANN, G.:
Virologische Arbeitsmethoden, Band 1.
Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1974

MORTON, D.L., MALMGREN, R.A., HOLMES, E.C., KETCHAM, A.S.:
Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence.
Surgery 64, 233-240 (1968)

NELSON, R.A., Jr.:
The immune-adherence phenomenon.
An immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis.
Science 118, 733-737 (1953)

NEUWELT, E.A., CLARK, W.K.:
Clinical aspects of neuroimmunology. 73-119
Baltimore: Williams and Wilkins 1978

NISHIOKA, K.:
Measurements of complement by agglutination of human erythrocytes reacting in immune adherences.
J. Immunol. 90, 86-97 (1963)

NISHIOKA, K., LINSCOTT, W.D.:
Components of guinea pig complement.
I. Separation of a serum fraction essential for immune hemolysis and immune adherence.
J. Exp. Med. 118, 767-793 (1963)

NISHIOKA, K., TACHIBANA, T., STOCK, C.C.:
Detection of antibody and antigen by immune adherence.
In: Y. Ithoh (ed.), Monograph of the 1st international symposium on tumor viruses. 253-264
Research Institute, Aichi Cancer Center, Nagoya (1967)

NISHIOKA, K., IRIE, R.F., KAWANA, T., TAKEUCHI, S.:
Immunological studies on mouse mammary tumors.
III. Surface antigens reacting with tumor-specific antibodies in immune adherence.
Int. J. Cancer 4, 139-149 (1969)

OETTGEN, H.F., OLD, L.J., BOYSE, E.A.:
Human tumor immunology.
Med. Clin. N. Amer. 55, 761-785 (1971)

OLD, L.J., BOYSE, E.A.:
Immunology of experimental tumors.
Ann. Rev. Med. 15, 167-186 (1969)

O'NEILL, Ch.:
An association between viral transformation and Forssmann antigen detected by IAA in cultured BHK 21 cells.
J. Cell Sci. 3, 405-421 (1968)

PFREUNDSCHUH, M., SHIKU, H., TAKAHASHI, T., UEDA, R., OETTGEN, H.F., RANSOHOFF, J., OLD, L.J.:
Serological analysis of cell surface antigens of human malignant brain tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 75, 5122-5126 (1978)

PIESSEN, W.F., LACHAPELLE, F.L., LEGROS, N.:
Facilitation of rat mammary tumor growth by BCG.
Nature (Lond.) 228, 1210-1211 (1970)

PIMM, M.V., COOK, A.J., BALDWIN, R.W.:
Failure of neuraminidase treatment to influence tumorigenicity or immunogenicity of syngeneically transplanted rat tumour cells.
Europ. J. Cancer 14, 869-878 (1978)

PRAGER, M.D., BAECHTEL, F.S.:
Methods for modification of cancer cells to enhance their antigenicity.
In: H. Busch (ed.) Methods in cancer research, Vol. 9, 339-400
New York: Academic Press (1973)

PREHN, R.T., MAIN, J.M.:
Immunity to methylcholantrene-induced sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 18, 769-778 (1957)

RAINBIRD, S., RIDLEY, A.:
Antigenicity of ethylnitrosourea-induced rat Schwannomas assayed by in vitro lymphocytotoxicity.
Neuropath. Appl. Neurobiol. 3, 9-14 (1977)

RAY, P.K., THAKUR, V.S., SUNDARAM, K.:
Antitumor immunity. I. Differential response of neuraminidase-treated and x-irradiated tumor vaccine.
Europ. J. Cancer 11, 1-8 (1975)

REICHNER, H.:
Zur Frage der serologischen Unterscheidung zwischen infiltrierendem Neoplasma (Gliom) und normalem Gewebe des Gehirns.
Z. Immunitätsforschung 80, 86-95 (1933)

REINER, J., SOUTHAM, C.M.:
Evidence of common antigenic properties in chemically induced sarcomas of mice.
Cancer Res. 27, 1243-1247 (1967)

ROITT, I.M.:
Leitfaden der Immunologie
Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag 1977

SANFORD, B.H.:
An alteration in tumor histocompatibility induced by neuraminidase.
Transplantation 5, 1273-1279 (1967)

SEDLACEK, H.H., MESSMANN, H., SEILER, F.R.:
Regression of spontaneous mammary tumors in dog after injection of neuraminidase-treated tumor cells.
Int. J. Cancer 15, 409-416 (1975)

SELL, K.W., SPOONER, R.L.:
Differential effectiveness of complement fixed by IgG and IgM antibodies in the cytolysis of the dog kidney tissue culture cells.
Immunology 11, 533-546 (1966)

SHEARER, G.M.:
Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 4, 527-533 (1974)

SHEIKH, K.M., APUZZO, M.L., KOCHSIEK, K.R., WEISS, M.H.:
Malignant glial neoplasms: Definition of a humoral host response to tumor-associated antigen(s).
Yale J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)

SHOHAM, J., INBAR, M., SACHS, L.:
Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumor development in vivo by concanavalin A.
Nature (Lond.) 227, 1244-1246 (1970)

SIMMONS, R.L., RIOS, A., RAY, P.K., LUNDGREN, G.:
Effect of neuraminidase on growth of a 3-methyl-cholanthrene-induced fibrosarcoma in normal and immunosuppressed syngeneic mice.
J. Natl. Inst. 47, 1087-1097 (1971)

SIMMONS, L.R., RIOS, A.:
Comparative immunotherapeutic effect of concanavalin A and neuraminidase-treated cancer cells.
Transplantation Proceedings 7, 247-251 (1975)

SIRIS, J.H.:
Concerning the immunological specifity of glioblastoma multiforme.
Bull. Neurol. Inst. New York 4, 597-601 (1936)

SJÖGREN, H.O.:
Transplantation methods as a tool for detection of tumor-specific antigens.
Progr. Exp. Tumor Res. 6, 289-322 (1965)

SOLHEID, C., LAURO, G., PALLADINI, G.:
Two separate membrane-bound antigens on human glioma cells in tissue culture detected with sera from glioma patients by immunofluorescence.
J. Neurol. Sci. 30, 55-64 (1976)

SPENCE, A.M., HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I., VAN BELLE, G., SULLIVAN, K., WAHLSTRÖM, T.:
Immunization against ethylnitrosourea-induced autochthonous neurogenic rat tumours.
Brit. J. Cancer 40, 164-167 (1979)

STAAB, H.-J., ANDERER, F.A.:
Structure and immunogenic behaviour of methylated tobacco mosaic-virus.
Biochem. Biophys. Acta 427, 453-464 (1976)

STAAB, H.-J., ANDERER, F.A.:
Immunogenicity of tumor cells modified with various chemicals.
Brit. J. Cancer 35, 395-402 (1977)

STAAB, H.-J., ANDERER, F.A.:
Chemical modification and immunogenicity of membrane fractions from mouse tumour cells.
Brit. J. Cancer 38, 496-502 (1978)

STAVROU, D.:
Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte.
I. Morphologische Befunde.
Acta neuropath. (Berl.) 15, 220-230 (1970)

STAVROU, D.:
Mögliche immunologische Aspekte bei experimentellen neurogenen Tumoren.
Zbl. Allg. Path. 120, 535 (1976)

STAVROU, D., ELLING, H., OSTERKAMP, U.:
Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)

STAVROU, D., ANZIL, A.P., ELLING, H.:
Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.
Acta neuropath. (Berl.) 43, 111-117 (1978 a)

STAVROU, D., ELLING, H., HAGLID, K.G.:
Demonstration of humoral antibodies against autologous glioma cells in experimental rabbit gliomas.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978 b)

STAVROU, D., OSTERKAMP, U., SCHRÖDER, B., ANZIL, A.P., ZÄNKER, K.:
Selected morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three experimental rat gliomas and their cells in vitro.
Exp. Cell. Biol. 47, 3-21 (1979)

STEELE, G. Jr., SJÖGREN, H.O.:
Cross-reacting tumor-associated antigen(s) among chemically induced rat colon carcinomas.
Cancer Res. 34, 1801-1807 (1974)

TACHIBANA, T., KLEIN, E.:
Detection of cell surface antigens on monolayer cells. I. The application of immune adherence on a micro scale.
Immunology 19, 771-782 (1970)

THOMAS, C., SIERRA, J.L., KERSTING, G.:
Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-Nitroso-N-methylharnstoff.
Naturwissenschaften 54, 228-229 (1967)

THUST, R.:
Langzeitkulturen experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems als Modelle für neuroonkologische Forschungen.
Zbl. allg. Path. 120, 274-283 (1976)

TOH, B.H., GAUCHI, M.N.:
Brain associated tumor antigens demonstrated by immunofluorescence.
Nature 250, 597-598 (1974)

TOH, B.H., GULI, E.P.G.:
In vitro immunoreactivity against ethylnitrosourea-induced tumours of the nervous system in rat.
Experientia 30, 1472-1473 (1974)

TROUILLAS, P.:
Carcino-fetal antigen in glial tumours.
Lancet 2, 552 (1971)

TROUILLAS, P.:
Immunologie des tumeurs cérébrales:
L'antigène carcinofetal glial.
Ann. Inst. Pasteur 122, 819-828 (1972)

TROUILLAS, P.:
Immunologie et immunothérapie des tumeurs cérébrales.
Etat actuel.
Revue Neurologique 128, 23-28 (1973)

WAHLSTRÖM, T., LINDER, E., SAKSELA, E.:
Glia-specific antigens in cell cultures from rabbit brain, human fetal and adult brain and gliomas.
Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 81, 768-774 (1973)

WAHLSTRÖM, T., LINDER, E., SAKSELA, E., WESTERMARK, B.:
Tumor-specific membrane antigens in established cell-lines from gliomas.
Cancer 34, 274-279 (1974)

WARNATZ, H.:
Tumorimmunologie.
Stuttgart: Thieme 1975

WATERS, H. (ed.):
The handbook of cancer Immunology, Vol. 3, A.
Immune status in cancer treatment and prognosis.
New York, London: Garland STPM Press 1978

WICKREMESINGHE, H.R., YATES, P.O.:
Immunological properties of neoplastic neural tissue.
Brit. J. Cancer 25, 711-720 (1971)

WIKSTRAND, C.J., MAHALEY, M.S., BIGNER, D.D.:
Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.
Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

WOOD, W.C., MORTON, D.L.:
Microcytotoxicity test: Detection in sarcoma patients of antibody cytotoxic to human sarcoma cells.
Science 170, 1318-1320 (1970)

WOOSLEY, R.E., MAHALEY, M.S. Jr., MAHALEY, J.L., MILLER, G.M., BROOKS, W.H.:
Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 3: Mikrocytotoxicity assays of specific responses of brain tumor patients.
J. Neurosurg. 47, 871-885 (1977)

YUHAS, J.M., TOYA, R.E., PAZINO, N.M.:
Neuraminidase and cell viability: failure to detect cytotoxic effects with dye-exclusion techniques.
J. Natl. Cancer Inst. 53, 465-468 (1974)

ZBAR, B., BERNSTEIN, I.D., BARTLETT, G.L., HANNA, M.G., RAPP, H.J.:
Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and prevention of lymph node metastases after intralesional injection of living mycobacterium bovis.
J. Natl. Cancer Inst. 49, 119-130 (1972)

Allen, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Form behilflich waren, möchte ich von Herzen danken.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. D. Stavrou.

Die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit in seinem Hause bot mir Prof. Dr. E. Dahme, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie.

Herr Dr. A.P. Anzil, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, gewährte mir bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen hilfreiche Unterstützung.

Beim experimentellen Teil meiner Arbeit stand mir Frau D. Wallmann freundlich zur Seite.

Vielfältige, technische Hilfeleistungen kamen von Frau A. Lechner und Herrn S. Lutz.

LEBENSLAUF

1952	Geboren am 12. November in Borås/Schweden Eltern: Carl-Gustaf Hultén, Diplom-Kaufmann Torborg Hultén, geb. Tengvall, Übersetzerin
1959	Eintritt in die Grundschule in Alingsås/Schweden
1960	Umzug nach Starnberg/BRD
1960	Eintritt in die Grundschule in Starnberg
1963	Übertritt in das Gymnasium Starnberg
1972	Zeugnis der Reife
1972	Beginn des Studiums der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1978	Abschluß der Tierärztlichen Prüfung
1978	Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie (Prof. Dr. D. Stavrou) der Universität München
1979	Approbation als Tierärztin
1980	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Funktionelle Pathologie am Institut für Tierpathologie der Universität München